

26.11.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 9 月 2 7 日

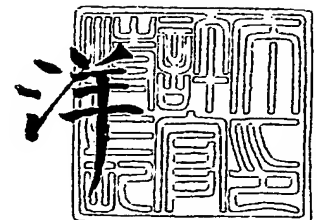
出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 2 7 9 4 5 0
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 2 7 9 4 5 0]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2 0 0 5 年 1 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 2 0 4 7 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 B44P02
【提出日】 平成16年 9月27日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明者】
 【住所又は居所】 千葉県柏市新柏 1 - 1 8 - 1 - 3 0 8
 【氏名】 渡辺 嘉典
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構
 【代表者】 沖村 憲樹
【代理人】
 【識別番号】 100107984
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 廣田 雅紀
【先の出願に基づく優先権主張】
 【出願番号】 特願2003-401943
 【出願日】 平成15年12月 1日
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 044347
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316356

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質

【請求項 2】

配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNA。

【請求項 3】

配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列の一部又は全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 4】

請求項 2 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 5】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 6】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質

【請求項 8】

配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNA。

【請求項 9】

配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列の一部又は全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 10】

請求項 8 記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 11】

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 12】

配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質。

【請求項 13】

以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質

【請求項 14】

配列番号 5 に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNA。

【請求項 15】

配列番号5に示される塩基配列又はその相補的配列の一部又は全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項16】

請求項14記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項17】

配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項18】

配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質。

【請求項19】

以下の(a)又は(b)の染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質

【請求項20】

配列番号7, 9, 11, 13, 15, 17又は19に示される塩基配列又はその相補的配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項21】

配列番号7, 9, 11, 13, 15, 17又は19に示される塩基配列又はその相補的配列の一部又は全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項22】

請求項7, 9, 11, 13, 15, 17又は19記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項23】

配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質。

【請求項24】

配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質。

【請求項25】

請求項5, 6, 11, 12, 23又は24記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び/又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

【請求項26】

請求項5, 6, 11, 12, 23又は24記載のタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項27】

抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項26記載の抗体。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規動原体タンパク質シュゴシン

【技術分野】

【0001】

本発明は、分裂酵母シゾザッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) に由来する *Rec 8* コヒーシンのプロテクタータンパク質 *Sgo 1* (シュゴシン) や、染色体分配制御活性を有するそのホモログやパラログ、並びにそれらをコードする DNA に関する。

【背景技術】

【0002】

真核生物においては、細胞周期が S 期の間に姉妹染色分体の接着が確立され、G 2 期全体を通して M 期まで保持される。有糸分裂の間、この接着は染色体の全長に沿って破壊され、姉妹染色分体が細胞の反対側へ分配することを可能にし (均等分裂)、各娘細胞が各染色体のコピーを 1 つ受け取ることを確実にしている。対照的に、減数分裂は 1 回の DNA 複製に続く 2 回の染色体分離からなり、それによって 1 個のディプロイド生殖細胞から 4 個のハプロイド配偶子が形成される。減数第一分裂の間、相同染色体 (ホモログ) は再結合するためにペアになり、一方のホモログから生成される姉妹染色分体が、他方のホモログから生成される姉妹染色分体に共有結合的に接着する、キアズマを形成する。したがって、ホモログが減数第一分裂で分離するためには、姉妹染色分体の接着は染色体腕部に沿って解離され、キアズマを解離しなくてはならない。しかし、姉妹染色分体の接着は減数第二分裂までセントロメアで保持され、有糸分裂で行うのと同様に姉妹染色分体が分離する場合に、残留した動原体性の接着を利用する。それ故、減数分裂では姉妹染色分体の接着が 2 段階で解離されることが必要とされる。しかし、減数第一分裂の間のみ、及びセントロメアにおいてのみ、動原体性の接着を保護するための分子機構は、未だ解決されていない (例えば、非特許文献 1 参照)。

【0003】

姉妹染色分体の接着の分子的特性と、分裂後期の開始時において姉妹染色分体の接着を解離する機構とに関する重要な手掛かりがある (例えば、非特許文献 1 ~ 5 参照)。様々な真核生物において、姉妹染色分体の接着は、*Scc 1* (分裂酵母シゾザッカロミセス・ポンベの *Rad 2 1*) を含む多サブユニットコヒーシン複合体に依存している。分裂後期促進複合体 (APC) 依存性のセキュリンの分解、*Cut 2* / *Pds 1* によって、*Cut 1* / *Esp 1* エンドペプチターゼ (セパララーゼ) を解離することが可能となり、順に *Rad 2 1* / *Scc 1* を切断し、姉妹染色分体の接着を解離する。減数分裂の間、コヒーシンサブユニット *Rad 2 1* / *Scc 1* は減数分裂における対応物である *Rec 8* によって置換される (例えば、非特許文献 6 ~ 10 参照)。 *Rec 8* 複合体は減数第一分裂後にセントロメアにのみ存在し、*Rec 8* を枯渇させることによって動原体性の接着が破壊されることから、セントロメアにおける *Rec 8* の存在によって、減数第一分裂全体を通して、接着の持続性が与えられると考えられてきた (例えば、非特許文献 11 参照)。染色体の腕部に沿った *Rec 8* は第一分裂後期にセパララーゼによって切断されるが、動原体性 *Rec 8* は特異的に第二分裂中期まで保護されることが、いくつかの証拠により示されている (例えば、非特許文献 12, 13 参照)。出芽酵母 *SPO 1 3* は動原体性 *Rec 8* の保護に関係しているが (例えば、非特許文献 14, 15 参照)、*SPO 1 3* は動原体性ではなく、間接的に機能すると考えられる。ショウジョウバエ *MEI-S 3 3 2* はセントロメアに存在するタンパク質であり、減数第一分裂の間に動原体性の接着が持続するために必要であり、且つ減数分裂における動原体性の接着のプロテクター候補としての特性を有するが、このような保護の詳細については今のところ解明されていない (例えば、非特許文献 4, 16 参照)。いくつかの生命体においてゲノムシーケンスプロジェクトが完成したにもかかわらず、これらのタンパク質のホモログは出現していないため、保護に関する一般的な見解を形成することができない。同時に、分裂酵母の研究は、動原体性 *Rec 8* 複合体をリクルートし、減数第一分裂中に動原体性の接着を確実にする、動原体周囲のヘテロ

クロマチンの重要性に焦点を当てている（例えば、非特許文献 1 7 参照）。しかし、減数第一分裂において、動原体周囲のヘテロクロマチンだけでは、減数第二分裂に対して、R e c 8 の特異的な保護を与えることができない。

【0 0 0 4】

- 【非特許文献 1】Annu Rev Genet 35, 673-745(2001)
- 【非特許文献 2】Curr Opin Cell Biol 12, 297-301(2000)
- 【非特許文献 3】Curr Biol 13, R104-14(2003)
- 【非特許文献 4】Annu Rev Cell Dev Biol 17, 753-77(2001)
- 【非特許文献 5】Genes Dev 16, 399-414(2002)
- 【非特許文献 6】Cell 98, 91-103(1999)
- 【非特許文献 7】Mol. Cell. Biol. 19, 3515-3528(1999)
- 【非特許文献 8】Nature 400, 461-4(1999)
- 【非特許文献 9】Genes Dev 15, 1349-60(2001)
- 【非特許文献 1 0】J Cell Biol 160, 657-70(2003)
- 【非特許文献 1 1】Nat Cell Biol 1, E125-7(1999)
- 【非特許文献 1 2】Cell 103, 387-98(2000)
- 【非特許文献 1 3】Embo J 22, 5643-53(2003)
- 【非特許文献 1 4】Genes Dev 16, 1659-71(2002)
- 【非特許文献 1 5】Genes Dev 16, 1672-81(2002)
- 【非特許文献 1 6】Cell 83, 247-256(1995)
- 【非特許文献 1 7】Science 300, 1152-5(2003)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

ヒトを含めたほとんどの真核生物は、ゲノムの混合を伴う進化的に優れた有性生殖によって子孫を増やしている。染色体を半数にする減数分裂は、有性生殖機構の中核をなす。体細胞分裂では、姉妹染色分体の二つの動原体は反対極から伸びたスピンドル微小管によってとらえられ、腕部と動原体の接着が同時に解除されることにより姉妹染色分体が両極に均等に分配される（均等分裂）。これに対し減数第一分裂では、姉妹染色分体の動原体は同一極から伸びたスピンドル微小管によってとらえられ、動原体の接着が保持されたまま同一極へ分配される（還元分裂）。続く減数第二分裂ではじめて姉妹染色分体の動原体部分の接着が解除されてそれぞれ二極に分かれ、結果として四つのハプロイドの配偶子が正確に作られる。減数分裂特有の還元分裂は、酵母からヒトにいたるほとんどの真核生物に保存された染色体分配様式であるが、その分子レベルの制御機構は長い間謎であった。本発明者は、分裂酵母を用いて、減数分裂特有の染色体接着因子コヒーシンが、この制御において本質的な役割を果たしていることを示してきた（上記非特許文献 8, 1 7 及び Nature 409, 359-363 (2001)）。本発明の課題は、コヒーシンと協調して減数第一分裂における姉妹動原体の同一方向性及び接着の維持を保証する因子として、分裂酵母シゾザッカロミセス・ポンベに由来する減数分裂特異的な新規動原体タンパク質 S g o 1（シュゴシン）や、染色体分配制御活性を有するそのホモログやパラログ、並びにそれらをコードする DNA を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

減数分裂には、ハプロイド配偶子を生成する 2 段階の特殊な核分裂が含まれている。これを達成するために、姉妹染色分体の接着は、初めに第一分裂後期に染色体腕部から、次に第二分裂後期にセントロメアから、段階的な方法で解離されなければならない。特に、減数第一分裂において動原体性の接着を保護する因子については、これまで解明されないままであった。本発明者らは、分裂後期に R e c 8 を保護するタンパク質を解明するために、R e c 8 と共発現する場合、有糸分裂の成長を抑制し、分裂後期における姉妹染色分体の分離を妨げる遺伝子を、分裂酵母遺伝子中にスクリーニングした。このアプローチに

より、分裂酵母における Rec 8 コヒーシンのプロテクターである、第一分裂後期において動原体性の Rec 8 を分解から保護（守護）する減数分裂特異タンパク質を見出し、Sgo 1（シュゴシン；守護神に由来）と命名した。そして、有糸分裂の染色体分離において、シュゴシンが重要な役割を果たすことも見出した。続いて、出芽酵母の Sgo 1 ホモログ及び分裂酵母の有糸分裂パラログ Sgo 2 を見出した。Sgo 1 とショウジョウバエ MEI-S332 との間のマージナルな類似性を同定し、他の真核生物における Sgo 1 ホモログも見出した。また、配列から予測した動物細胞のシュゴシン類似タンパク質が、機能的にも酵母のシュゴシンと保存性があることも見出した。本発明はこれら知見に基づき完成するに至ったものである。

【0007】

すなわち本発明は、(a) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質又は (b) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 1）や、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列からなる DNA（請求項 2）や、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列の一部または全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 3）や、請求項 2 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 4）や、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 5）や、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質（請求項 6）に関する。

【0008】

また本発明は、(a) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質又は (b) 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 7）や、配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列からなる DNA（請求項 8）や、配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列の一部または全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 9）や、請求項 4 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 10）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 11）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質（請求項 12）に関する。

【0009】

本発明はまた、(a) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質又は (b) 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 13）や、配列番号 5 に示される塩基配列又はその相補的配列からなる DNA（請求項 14）や、配列番号 5 に示される塩基配列又はその相補的配列の一部または全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 15）や、請求項 6 記載の DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードする DNA（請求項 16）や、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項 17）や、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質（請求項 18）に関する。

【0010】

本発明はまた、(a) 配列番号 8, 10, 12, 14, 16, 18 又は 20 に示される

アミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質又は(b)配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項19)や、配列番号7, 9, 11, 13, 15, 17又は19に示される塩基配列又はその相補的配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項20)や、配列番号7, 9, 11, 13, 15, 17又は19に示される塩基配列又はその相補的配列の一部または全部を含み、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項21)や、請求項7, 9, 11, 13, 15, 17又は19記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA(請求項22)や、配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質(請求項23)や、配列番号8, 10, 12, 14, 16, 18又は20に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質(請求項24)に関する。

【0011】

さらに本発明は、請求項5, 6, 11, 12, 23又は24記載のタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質(請求項25)や、請求項5, 6, 11, 12, 23又は24記載のタンパク質に特異的に結合する抗体(請求項26)や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項26記載の抗体(請求項27)に関する。

【発明の効果】

【0012】

本発明のシュゴシンは真核細胞に広く保存された染色体分配制御因子で、染色体分配における機構解明の他、体細胞分裂では癌の誘発機構、また減数分裂では不妊症あるいはダウン症などの染色体分配疾患などの研究に、有利に用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の対象となるタンパク質としては、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質Sgo1(シュゴシン)や、該配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質や、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質Sgo1のパラログSgo2や、該配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質や、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなる染色体分配制御活性を有するタンパク質Sgo1のサッカロミセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)ホモログScSgo1や、該配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質や、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるノイロスボラ・クラッサ(*Neurospora crassa*)由来の染色体分配制御活性を有するタンパク質(NC)や、該配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質や、配列番号10又は12に示されるアミノ酸配列からなるシロイヌナズナ由来の染色体分配制御活性を有するタンパク質(At)や、該配列番号10又は12に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質や、配列番号14又は16に示されるアミノ酸配列からなるマウス由来の染色体分配制御活性を有するタンパク質(Mm)や、該配列番号14又は16に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性

を有するタンパク質や、配列番号18又は20に示されるアミノ酸配列からなるヒト由来の染色体分配制御活性を有するタンパク質(Hs)や、該配列番号18又は20に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質を挙げることができる。また、上記染色体分配制御活性としては、染色体分配を制御する活性であれば特に制限されないが、好ましくは生殖細胞の染色体分配及び／又は体細胞分裂の染色体分配を正しく制御する活性を、より好ましくは減数第一分裂において姉妹染色分体の動原体が離れないように保護(守護)する活性を挙げることができる。なお、本発明のタンパク質はそのDNA配列情報等に基づき公知の方法で調製することができ、その由来は酵母、マウス、ヒト等に限定されるものではない。また、例えば、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質であるSgo1(シュゴシン)変異体は、ポイントミューテーション等の公知の遺伝子操作により常法により作製することができる。

【0014】

本発明の対象となるDNAとしては、上記本発明の染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、分裂酵母シゾザッカロミセス・ポンベに由来する配列番号1又は3に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNA、並びにこれらの配列の一部または全部を含む染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、サッカロミセス・セレビジェに由来する配列番号5に示される塩基配列又はその相補的配列からなるDNA、並びにこれらの配列の一部または全部を含む染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、ノイロスボラ・クラッサに由来する配列番号7に示される塩基配列又はその相補的配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA、並びにこれらの配列の一部または全部を含む染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、シロイヌナズナに由来する配列番号9又は11に示される塩基配列又はその相補的配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA、並びにこれらの配列の一部または全部を含む染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、マウスに由来する配列番号13又は15に示される塩基配列又はその相補的配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA、並びにこれらの配列の一部または全部を含む染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、ヒトに由来する配列番号17又は19に示される塩基配列又はその相補的配列からなり、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA、並びにこれらの配列の一部または全部を含む染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAや、かかるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNA等を例示することができる。

【0015】

これらDNAは、そのDNA配列情報等に基づき、例えば酵母、マウス、ヒト等の遺伝子ライブラリーやcDNAライブラリーなどから公知の方法により調製することができる。また、配列番号1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19等々に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部又は全部をプローブとして、酵母、マウス、ヒト等のDNAライブラリーに対してストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションを行ない、該プローブにハイブリダイズするDNAを単離することにより、目的とする染色体分配制御活性を有するタンパク質をコードするDNAを得ることもできる。かかるDNAを取得するためのハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を適宜

組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0016】

本発明の融合タンパク質としては、前記本発明のタンパク質とマーカートンパク質及び／又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリホスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用したタンパク質Sgo1等の精製や、当該分野の研究用試薬としても有用である。

【0017】

本発明のタンパク質に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げることができ、これらは上記Sgo1等のタンパク質又はその一部を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の抗体は、生体内におけるSgo1等の局在を明らかにする上で有用である。

【0018】

上記の本発明の抗体は、慣用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に本発明のタンパク質若しくはエピトープを含むその断片、又は該タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらず、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985）など任意の方法を用いることができる。

【0019】

本発明のタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、本発明のタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。本発明のタンパク質やその抗原エピトープを含むペプチドに対する抗体は、染色体分配制御因子を指標とした癌や不妊症あるいはダウン症などの染色体分配疾患の診断や治療に使用できる可能性がある。

【0020】

また前記モノクローナル抗体等の抗体に、例えば、FITC（フルオレセインイソシアネート）又はテトラメチルローダミンイソシアネート等の蛍光物質や、¹²⁵I、³²P、¹⁴C、³⁵S又は³H等のラジオアイソトープや、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ又はフィコエリトリン等の酵素で標識したものや、グリーン蛍光タンパク質（GFP）等の蛍光発光タンパク質などを融合させた融合タンパク質を用いることによって、本発明のタンパク質の機能解析を行うことができる。また本件発明の抗体を用いる免疫学的測定方法としては、RIA法、ELISA法、蛍光抗体法、プラーク法、スポット法、血球凝集反応法、オクタロニー法等の方法を挙げることができる。

【0021】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0022】

[方法]

(R e c 8 プロテクターのスクリーニング)

本発明者らは栄養細胞においてR e c 8と共発現した場合のみ毒性となる遺伝子を調べた。G F Pと融合したシーケンスをコードするR e c 8を、チアミン抑制n m t 1+プロモータのもとでp R E P 8 2 (u r a 4+マーカー)にクローニングし、p R E P 8 2-r e c 8+-G F Pを構築した。減数分裂細胞から調製されたm R N Aを用いて構築したシゾサッカロミセス・ポンベc D N Aライブラリー、及びp R E P 3ベクター(n m t 1+プロモータ、L E U 2+マーカー)(Y. Akiyoshi and Y. W. 未発表)を使用した。p R E P 8 2-r e c 8+-G F Pを保有するl e u 1 u r a 4-D 1 8細胞はc D N Aライブラリーでトランスフォームし、チアミン(プロモータオフ)を含む寒天プレート上に広げられ、30℃で30日間培養された。次に、コロニーが2枚のチアミンを含まない寒天プレート上、すなわち、一方はプラスミドp R E P 8 2-r e c 8+-G F Pを欠落した細胞のみが成長することができる、ウラシル及び5'-F O A (5'-fluoroorthoic acid)を含むプレート上で複製され(それによりライブラリクローンのみを発現する)、他方は5'-F O Aを含まないプレート上で複製される(r e c 8+-G F Pとライブラリクローンとの共発現を可能にする)。本発明者らは、死滅した細胞を赤色染色する薬品であるPhloxine Bを両寒天プレートに加え、それにより病態のコロニーに焦点を当てた。2日間の培養後、共発現寒天プレートでのみ病態を示すコロニーを取り上げ、ライブラリー由来のプラスミドを回収して解析した。

【0023】

(シゾサッカロミセス・ポンベ株)

内因性s g o 1+及びs g o 2+へのG F P又はF L A Gタグ付け及び削除を、P C Rベースの遺伝子ターゲティング法(Yeast 14, 943-951(1998))によって実施した。P C R増幅s g o 1+-F L A GのC末端にG F Pを挿入することによりs g o 1+-F L A G-G F Pが作製され、内因性s g o 1の遺伝子座に組み込まれた。さらに、P C Rベースの遺伝子ターゲティング法によって、s g o 1+の内因性プロモータをn m tプロモータと置換し、P n m t-s g o 1+又はP n m t-s g o 1+-F L A G-G F Pを作出した。必要に応じて、S g o 1-G F P又はS g o 1-F L A Gにタグ付けされたタンパク質を削除した。文献(Nature 400, 461-4(1999))記載のように、減数第一分裂の前(減数第一分裂前期の後期に近接した時期)に、減数分裂細胞を抑止するためにm e i 4 Δ変異体を使用し、減数第一分裂後に抑止するためにm e s 1 Δを使用した。

【0024】

(G F Pでマークされた染色体の観察)

減数第一分裂におけるホモログの分離パターンを観察するために、c e n 2-G F P (Embo J 22, 2284-96(2003))を保持するh 9 0細胞が、減数分裂誘導培地S P Aにスポットされた。姉妹染色分体の分離パターンを調べるために、一方はc e n 2-G F Pでマークされ、他方はマークされていない異なる接合型細胞が混合され、S P A上にスポットされた。1日間培養された後、接合体がG F Pについて観察された。冷却C C Dカメラ(Quantix, Photometrics)を備えた顕微鏡(Axioplan2, Zeiss)、及びMetamorph software (Universal Imaging Corporation)のもとで、画像を得た。G F Pシグナルの7つのZセクションは、画像の各ピクセル位置における最大値のシグナルを取ることによって、単一の二次元の画像に変換した。

【0025】

(クロマチン免疫沈降; C h I P)

S g o 1を有するC h I Pについては、ディプロイドs g o 1+-F L A G-G F Pを使用した。高度に同調的な培養を達成するために、内因性s l p 1+プロモータを減数分裂中は活性化しないr a d 2 1+プロモータと置換し、第一分裂中期に細胞を抑止した。細胞は、窒素枯渇培地において30℃で17時間培養され、60%以下の細胞を第一分裂中期に抑止した。S g o 2を有するC h I Pについては、n d a 3-K M 3 1 1 s g o 2+-G F P細胞を30℃で増殖させ、その後18℃に移行した。8時間の培養の後、ほとんどの細胞を分裂中期に抑止した。細胞は3%のパラホルムアルデヒドで18℃で30分

間固定され、抽出物が作製された。DNAは平均サイズが400bpまでに破壊され、抽出物は、ウサギ抗GFP抗体 (Clontech) で免疫沈降された。全細胞粗製抽出物から作製されたDNA、又は免疫沈降されたクロマチンのフラクションは、LightCycler又はLightcycler-DNA Master SYBR Green I kit (Roche Molecular Biochemicals) で、定量的なPCRによって解析された。ChIPフラクションにおける非特異的な結合を説明するために、各実験におけるコントロールとして抗体不含サンプルを用いた。

【0026】

(抗Sgo1抗体の作製)

sgo1+ORFはシゾサッカロミセス・ポンベcDNAライブラリーからのPCR増幅物であり、組換えタンパク質GST-Sgo1及びHis-Sgo1を作製するために、プラスミドpGEX4T-2 (Pharmacia Biotech) 及びpET-19b (Novagen) にそれぞれ挿入された。文献 (Embo J 22, 5643-53(2003)) 記載の通り、GST-Sgo1はウサギを免疫化するために使用され、産生された抗体はHis-Sgo1によって精製した。また、ヒトのシュゴシン相同遺伝子 (配列番号17、19) のコードするタンパク質 (配列番号18、20; それぞれhSgo1, hSgo2とする) の解析を行う目的で、hSgo1, hSgo2の一部を大腸菌に発現させ、そのタンパク質をウサギに注射することによりhSgo1, hSgo2に対する抗体を作製した。

【0027】

(免疫染色)

内因性Sgo1を染色するために、MM-Nで5時間培養された野生型ディプロイド細胞を、30℃で40分間3%のホルムアルデヒドで固定し、文献 (Embo J 22, 5643-53(2003)) 記載の方法によって染色した。Sgo2-GFP及びMis6-HAを染色するために、対数的に成長している細胞を使用した。1:50でウサギ抗Sgo1抗体及び1:100でAlexa488結合の抗ウサギ抗体 (Molecular Probes) を用いてSgo1を検出した。1:200でマウス抗チューブリン抗体TAT-1 (Keith Gull氏から供与)、及び1:2000でCy3タグ付け抗マウス抗体 (Chemicon) を用いてチューブリンを検出した。DNAを可視化するために、細胞をDAPIで対比染色した。1:50でマウス抗GFP抗体 (Roche)、及び1:100のBODIPY FL結合抗マウス抗体 (Molecular Probes) を用いてSgo2-GFPを検出した。1:50でウサギ抗HA抗体Y-11 (Santa Cruz)、及び1:100でAlexa488結合抗ウサギ抗体を用いてMis6-HAを検出した。DNAを可視化するために、細胞をDAPIで対比染色した。また同様に、ウサギ抗hSgo1抗体及びウサギ抗hSgo2抗体を用いて免疫染色を行った。

【0028】

(共免疫沈降)

Padh-rec8+-3HA Pnmt41-sgo1+-FLAG-GFP株細胞及び、コントロールとしてのPadh-rec8+-3HA株細胞を、30℃で15時間チアミンを用いずに培養し、収集し、抽出物を作製した。クロマチン結合タンパク質を遊離させるために、DNase1で抽出物を処理した。遠心分離によって抽出物を清澄化した後、Sgo1-FLAG-GFPタンパク質を、抗FLAG抗体M2 (Sigma) で免疫沈降した。抗HA抗体Y-11及び抗FLAG抗体M2によって、それぞれRec8-3HA及びSgo1-FLAG-GFPを検出した。

【0029】

(出芽酵母の解析)

すべての供試株は、染色体ロスアッセイに関するものを除き、SK1 (Cell 98, 91-103(1999)) の派生物であった。染色体ロスアッセイを文献 (Nature 410, 955-9(2001)) 記載の通り実施した。PCR生成カセット (Yeast 14, 953-961(1998)) を使用して、ScSGO1遺伝子を削除、又はエピトープタグを付けた。正確な遺伝子ターゲットをPCRによってチェックした。染色体VをマーキングしたURA3-GFPドット (cenV-GFP) については前述されている (Cell 98, 91-103(1999))。文献 (Dev Cell

4, 535-48(2003)) 記載の通り、30℃でディプロイド細胞を培養することにより、孢子形成が誘引された。インサイチュ蛍光免疫法(in situ immunofluorescence)を文献(Dev Cell 4, 535-48(2003)) 記載の通り実施した。

【0030】

(RNAi)

hSgo1 RNA又はhSgo2 RNA上に、siRNAターゲット配列として、hSgo1: AAGUCUACUGAUAUGUCUUATT (配列番号38) と hSgo2: AAGCACUACCACUUUGAAU AATT (配列番号39) をそれぞれ選択した。また、Bub1 RNA上にsiRNAターゲット配列としてGAGUGAUCACGAUUUCUAATT (配列番号41)を、スピンドルチェックポイント因子BubR1 RNA上に、siRNAターゲット配列を2箇所AACGGGCAUUUGAAUAUGAA A (配列番号40; JCS, 117, 1577-1589 (2004)参照)を選択した。これらの配列を二本鎖として合成し、オリゴフェクタミン(インビトロジェン社)を用いて細胞へ導入した。HIVベクターの作製に当たっては、HeLa細胞に対して、HIVプラスミドベクター、pMD.G (VSV-G env 発現プラスミド)、pMDLg/p.RRE (第3世代パッケージングプラスミド) 及びpRSV Rev (Rev発現プラスミド) を、リン酸カルシウム法により、トランスフェクションを行い、48時間後の培養上清を回収後、濃縮してウイルスベクターとして用いた。

【実施例2】

【0031】

[結果]

(分裂酵母におけるシュゴシンSgo1の同定)

有糸分裂コヒーシンRad21/Scc1を減数分裂バージョンであるRec8と置換することは、減数第一分裂後期を通して動原体性姉妹染色分体の接着を保護するための必須条件である(Cell 103, 1155-68(2000)、Mol Cell Biol 23, 3965-73(2003))。しかし、有糸分裂中に異所的にRec8を発現させた場合、Rec8はセントロメアに広く局在したが、姉妹染色分体が反対側に分離するにつれて分裂後期には消滅した(図1c、d)。さらに、有糸分裂中に、切断不可能なRec8が異所的に発現した結果(Rec8は減数分裂中に、セパラーゼCut1により切断されることに留意(Embo J 22, 5643-53(2003)))、姉妹染色分体の分離が不能となった(図2参照)。したがって、減数第一分裂中の状況とはコントロール的に、動原体性Rec8は有糸分裂中にセパラーゼによって切断され、結果的に姉妹染色分体が分離する。これらの観察から、本発明者らはRec8の減数第一分裂特異性動原体プロテクターを仮定するに至った。この因子を発見するために、本発明者らは、Rec8と共発現した場合にのみ有糸分裂成長中に毒性を発生する遺伝子を調査した。このスクリーニングによって新規遺伝子sgo1+ (ORF: SPBP 35G2.03C)を見い出した。Rad21と共発現した場合、Sgo1は成長に関してほとんど影響を及ぼさないため、Sgo1による成長の妨害はRec8に大きく依存している(図1a)。セントロメア会合緑色蛍光タンパク質マーカー(cen2-GFP)が高頻度で中核細胞(図1b、c参照)の同じ側に分離されるため、rec8+とsgo1+との共発現の結果、核分裂がブロックされる(blocked nuclear division)頻度が高まる。分裂後期にSgo1がRec8を分解から保護する可能性をテストするために、Sgo1発現に関連してRec8の局在を調べ、構成性染色質adh1プロモータの制御下で、そのカルボキシル末端にGFPタグ付けしたRec8を発現させ、チアミン抑制nmt1プロモータを用いてSgo1を誘導した。その結果、Sgo1が共発現した場合にのみ、分裂後期を通してRec8-GFPシグナルが持続することを見い出した(図1d)。Sgo1が減数分裂においてのみ発現することから、(DNAマイクロアレイデータ(Nat Genet 32, 143-7(2002))、下記参照)、上述の結果によって、Sgo1が減数分裂の間はRec8のプロテクターであることがわかった。

【0032】

(Sgo1は減数第一分裂における動原体性の接着を保護する)

減数分裂中のRec8の保護に関して、Sgo1が本当に必要であることを調べるために

、sgo1+をコードするORF全体を除去し、表現型を調査した。sgo1+は減数分裂特異遺伝子であるという概念に一致して、sgo1Δ細胞は生育可能であり正常な増殖的成長を示した。sgo1Δ細胞の減数分裂の染色体分離を調べるために、接合体の2つのホモログのうち一方についてのみ、セントロメア関連シーケンスをGFP (cen2-GFP) でマークし、減数第一分裂の間、GFPドットの分離をモニターした。姉妹染色分体ペアが、各接合体の同じ側へ概ね一緒に移動したことから、減数第一分裂はsgo1Δにおいて正常に出現することがわかった。したがって、単極性接着は損なわれていなかった(図3a)。さらに、両染色体におけるcen2-GFPをマークすることにより、減数第一分裂でホモログが正確な染色体の分離を行ったと判定した(データは示さず)。しかし、減数第二分裂においては、姉妹染色分体ペアは適切に分離せず、50%以下の細胞において染色体不分離を起こした(図3a)。この値は減数第二分裂におけるランダムな染色体分離と一致している。

【0033】

動原体性の接着を調べるために、mes1Δ突然変異を経て減数第二分裂の前に抑止された接合体における両ホモログをマークしたcen2-GFPを観察した。上記結果を裏付けるかのように、分割されたcen2-GFPシグナルが二分染色体核にいきわたり、sgo1Δ細胞はセントロメアの早期分裂を示すことが多い(図3b)。最終的に、セントロメアにおけるRec8の保護がSgo1に依存しているかについて、第一分裂後期の後期及び第二分裂前中期のRec8-GFPを観察することにより調べた。野生型細胞においてはRec8シグナルが動原体性であることが顕著であるのに対し、sgo1Δ細胞のこれらのステージにおいては、セントロメアからRec8シグナルの多くが消失した(図3c)。sgo1Δ細胞のすべての表現型は、ヘテロクロマチン欠損のシゾサッカロミセス・ポンペを連想させるが、ここでRec8の動原体周囲領域への局在は減少し、動原体性の接着は減数第一分裂の間に失われ、減数第二分裂におけるランダムな分裂を導く(Science 300, 1152-5(2003))。クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを用いて、減数第一分裂の前に抑止された細胞のRec8によるクロマチン結合を調べた。ヘテロクロマチン欠損細胞とは全く対照的に、Rec8の局在は他のすべてのテスト領域と同様、動原体周囲領域のsgo1Δ細胞においても損なわれていなかった。これらの結果は、減数第一分裂後の動原体性Rec8の消失が、セントロメアへのRec8局在における初期の欠損によって生じるのではなく、むしろ減数第一分裂における動原体性Rec8の保存における欠損によって生じることを示唆する。上述の結果によって、Cut1セパラーゼが第一分裂後期の開始時に活性化し、染色体性Rec8のほとんどを切断し、動原体性Rec8のみを残すことを示している(Embo J 22, 5643-53(2003))。これらの結果は、減数第一分裂期を通してセパラーゼによる切断からコヒーシンRec8を保護することにより、動原体性の接着を保護する上でSgo1が必須の役割を果たしていることを示している。

【0034】

(Sgo1は減数第一分裂中にセントロメアに局在する)

Sgo1タンパク質を検出するために、Sgo1特異的抗体を作製し、ウエスタンブロット法によりSgo1が専ら減数第一分裂期に発現することを示した(図4a)。減数分裂の様々なステージにある細胞に対して免疫蛍光顕微鏡検査法を実施し、Sgo1が第一分裂前期の終期に出現し、いくつかのドットとして第一分裂中期までに十分に局在することが明らかになった(図4b)。これらのドットはMis6動原体タンパク質(Cell 90, 131-143(1997))と共存し、Sgo1がセントロメア会合タンパク質であることを示している(図4c)。第一分裂後期の開始時に、Sgo1シグナルが劇的に減少する。第一分裂中期に抑止されたAPC枯渇細胞のセントロメアにおいては、Sgo1は分解されていないが、セパラーゼ欠損細胞においては正常な分解が起きていることを見出し(図5)、第一分裂後期におけるSgo1の分解が、セパラーゼを介してというよりも、APCによってより直接的にレギュレートされていることを示した。第一分裂後期の初期のセントロメアにおいて残留Sgo1シグナルを検知することができたが、それらは第一分裂後期

の終期までには完全に消失した(図4b)。これは、セパラーゼが十分に活性化した場合、第一分裂後期の開始時にかなりの量のSgo1が必要とされることを示している。しかし、第一分裂後期が進行するにつれて、必要とされるSgo1は少量になっていくと考えられる。この考え方は、セパラーゼ活性が素早くダウンレギュレートされる場合、あるいは第一分裂後期の間に染色体へのアクセスが妨げられる場合に論証可能である。Sgo1は減数第二分裂では全く出現せず(図4b)、Sgo1は、減数第一分裂においてのみRec8を保護するために必要であるという考え方と一致する。

【0035】

本発明者らは、Rec8の動原体周囲領域における局在が、減数第一分裂全体を通して動原体性の接着が持続するために、特に重要であることを既に報告(Science 300, 1152-5(2003))している。Sgo1がRec8の動原体性プロテクターである場合には、そこに局在することもまた予測された。この可能性をテストするために、ChIPアッセイを用い、Rec8の局在をより正確に描写した。Sgo1は実際にセントロメアシーケンスに沿って、中心核領域よりはむしろ、動原体周囲のヘテロクロマチン領域と会合している(図4d)。免疫沈降実験によって、インビボでSgo1がRec8複合体と相互に作用していることが示されるように(図4f)、保護は密接な相互作用を通じて実行される。同時に、これらの結果は、Sgo1は動原体周囲領域に残留し、第一分裂後期において、セパラーゼによる切断から動原体性Rec8を保護するために作用することを示している(図4d)。Rec8の局在はSgo1に依存しておらず、逆もまた同様であることを見出した(図3d、図示せず)。実際には、Rec8とSgo1とはむしろ独立して動原体周囲領域に産生されるが、局在に関しては、Rec8はヘテロクロマチンに依存し、Sgo1はBub1キナーゼに依存している(図4e)。対照的に、Sgo1とRec8はそれぞれ、swi Δ 6(ヘテロクロマチン欠損)及びbub1 Δ 細胞にあるセントロメアに局在している(図4e)。このように独立して局在することにより、染色体腕部領域に沿うことなく、セントロメアのみでRec8を保護することが確実となる。

【0036】

また、シュグシンがセパラーゼの作用からRec8を物理的にシールドし、これを相殺することを示す。この点において、Sgo1の強い過剰発現が、Rec8が発現していない場合であっても、有糸分裂の成長を中程度に妨害し(図示せず)、cut1対立遺伝子に対して許容的な温度である場合であっても、Sgo1が穏やかに発現することによりcut1変異体を殺す(図6)ことが見い出された。

【0037】

(Sgo2は分裂酵母における有糸分裂Sgo1パラログである)

従来の遺伝子データベースのブラスト検索によって、本発明者らは、サッカロミセス・セレビジエ及びノイロスボラ・クラッサからSgo1類似のタンパク質を見出し、Sgo1が保存されたタンパク質であることを示した(下記参照)。また、同検索において、本発明者らがSgo2と名付けたシゾサッカロミセス・ポンベSgo1パラログを見出した(ORF:SPAC15A10.15)。sgo2+遺伝子を分裂させ、sgo2 Δ 細胞が生存可能であるが、スピンドル不安定化剤チアベンダゾール(TBZ)に対して感受性を示すことを見出した(図7a)。sgo1 Δ 細胞がその種の欠陥を全く示さないことから、この表現型は注目値する。その細胞分配について調べるために、内因性sgo2+遺伝子にGFPタグを付けた。増殖細胞において、Sgo2-GFPは2つ又は3つのドットとして核内で観察された(図7d)。しかし、Sgo2-GFPはセントロメアタンパク質Mis6と有糸分裂中期において共存し、分裂後期の間に消失する(図7c、d)。ChIPアッセイは、Sgo2クロマチン会合が有糸分裂細胞の同調ポピュレーションにのみ検出可能であり、クロマチン会合は動原体周囲領域に局在していることを示した(図7e)。この局在を強化し、ヘテロクロマチン欠損swi6 Δ 突然変異体と結合した場合、sgo2の削除は染色体の分離に劇的な欠陥を与えるが、これ自体は動原体の機能をわずかに損なうものである(Science 269, 1429-31(1995))(図7b)。これらの結果は、有糸分裂における染色体の分離を確実にするために、Sgo2が動原体性へ

テロクロマチン因子と協働していることを示している。さらに、減数第一分裂におけるホモログの染色体不分離において、*s g o 2 Δ*細胞がある程度増加(～15%)したことを見出し、適切な減数第一分裂を促進させるためには、*S g o 2*もまた重要であることを示した。しかし、*s g o 1 Δ*は減数第一分裂において明らかな欠陥を引き起こさず(図3a)、また減数分裂における*s g o 2 Δ*の欠陥を強化しないことから、*S g o 2*の役割は*S g o 1*の役割と重複してはいない。

【0038】

(*B u b 1*に制御されるシュゴシンの局在)

分裂酵母*b u b 1*変異体において、減数第一分裂以降は動原体性*R e c 8*を検出できないことから、保存されたセントロメア会合キナーゼ*B u b 1*は、減数分裂の間*R e c 8*を保護する際に機能すると考えられている。(Nat Cell Biol 3, 522-6(2001)、図3c)。*b u b 1*変異体は減数第一分裂の染色体分離において多面的に影響を及ぼしているが、*S g o 1*の機能は*B u b 1*活性によって標的とされうると考えられる。この問題を解明するために、減数分裂が起こっている*b u b 1 Δ*細胞において、*S g o 1*-GFPシグナルを調べた。明らかに、*b u b 1 Δ*細胞は正確な動原体性*S g o 1*-GFPシグナルをほぼ完全に欠いており、代わりに核内に拡散した蛍光を示した(図4e)。キナーゼ活性を消滅させる*b u b 1*-K762R点突然変異を用いて、同様の結果を得た(Embo J 22, 1075-87(2003))。*S g o 1*タンパク質の実質的なレベルは、減数分裂*b u b 1 Δ*細胞においてウエスタンブロット解析によって検出されるが(図示せず)、*B u b 1*は*S g o 1*タンパク質の安定性に影響を及ぼさない。したがって、*B u b 1*のキナーゼ活性は*S g o 1*をセントロメアに取り込むために必要となり、*b u b 1 Δ*細胞における動原体の保護に見られる欠損は、*S g o 1*の局在が損なわれることにより説明することができる。

【0039】

並行した実験において、セントロメアにおける有糸分裂*S g o 2*の局在は、*b u b 1*変異体において同様に妨害されることを見出した(図7c)。*B u b 1*機能を失うことによって、動原体の機能が弱まると指摘されてきた(J Cell Biol 143, 1775-87(1998))。この点に関して、*b u b 1*-K762R変異体は、動原体周囲でのヘテロクロマチン形成における役割を通じて、同様に動原体機能をわずかに損なう突然変異である*s w i 6 Δ*に対して共致死性を示す。*s g o 2 Δ*が同様に*s w i 6 Δ*に対して共致死性を示し(図7b)、有糸分裂において重大な染色体分離ミスを示すことを見出した(図示せず)。*s g o 2 Δ b u b 1 Δ*二重変異体が、成長又はTBZ感受性について累積的欠陥をまったく示さなかったことから(図7a)、これらの遺伝子解析により、有糸分裂における染色体の分裂を確実にするための、*S g o 2*と*B u b 1*とのタンデム機能を確認した。これらの全てを考慮すると、以上の結果は、セントロメアに*S g o 1*及び*S g o 2*をそれぞれ減数分裂及び有糸分裂において取り込むことが、*B u b 1*キナーゼの重要な機能であることを示している。

【0040】

(出芽酵母*S g o 1*ホモログの特性)

本発明者らは、出芽酵母における、これまで解析されたことのない一つの*S g o 1*ホモログである*S c S g o 1*(ORF:YOR073W)を同定した。内因性*S c S G O 1*にGFPタグを付けることによって、*S c S g o 1*の細胞内の局在について調べた。*S c S g o 1*-GFPは増殖細胞において主として単一ドットとして検出されたが、これはポピュレーションのうち限定されたサブセットでのみ検出された(図8a)。*S c S g o 1*-GFPはG1/S期(すなわち細胞内に芽がない場合、又は細胞内の芽が小さい場合)では検出されないが、G2/M期(芽が大きく、単一核を有する細胞)ではドットとして出現し、分裂後期(芽が大きく、核を伸ばしている細胞)では消滅する(図8a)。ドットは*N d c 1 0*動原体タンパク質と共局在している(図8b)。減数分裂の間、*S c S g o 1*-GFPは第一分裂中期にのみ動原体で検出されるが、第一分裂後期及び減数第二分裂においては全く検出されない(図8c)。したがって、*S c S g o 1*局在パターンは減数分裂における*S p S g o 1*、及び有糸分裂における*S p S g o 2*のパターンに酷似してい

る。

【0041】

S c S g o 1 の機能を調べるために、S c S G O 1 遺伝子を分裂させた。S c s g o 1 Δ細胞は生存可能ではあるが、成長が遅く、スピンドル不安定化剤ベノミルに対する感受性を示し(図8 d)、動原体機能を損なう恐れがあることを示した。また、コロニーセクタリングアッセイを用いて、S c s g o 1 Δ細胞と野生型細胞とでクロモソーム損失率を比較した。40%のS c s g o 1 Δコロニーが赤色セクター(クロモソームの損失を示す)を含んでいたが、野生型コロニーでは2%未満であった(図8 e)。有糸分裂の染色体分離を確実にするために、S c S g o 1 が動原体において重大な役割を果たしている結論付けた。S c s g o 1 Δ細胞は減数分裂開始の際に、多くの細胞が減数分裂状態で単一の核に抑止されているという重大な欠陥を示した。しかし、リークした減数分裂のテトラニュークリエート生成物のうち、c e n V-GFPの分配パターンは、減数第二分裂におけるランダムな分離を除き、減数第一分裂における適切な分離と一致している(図8 f)。また、カルボキシル末端において染色体S c S G O 1 に13 M y c タグを付けることは、それ自体は有糸分裂の成長又は減数第一分裂で検出可能な欠陥を引き起こさないが、減数第二分裂における分離を損ねる結果となる(34%の染色体不分離が68%のランダム分離を示す)ことを見出した(図8 g)。さらに、S c S G O 1-M y c 細胞は減数第一分裂後期の後期において姉妹セントロメアの分離を頻繁に示し(図8 h)、動原体性の接着が適切に保護されていないことを示した。同時に、これらの結果は、減数第一分裂全体を通して動原体性の接着を保護する上でS c S g o 1 が重要な役割を果たしており、それにより分裂酵母S g o 1 と同様に減数第二分裂を確実にしているとの考えを支持する。

【0042】

(真核生物でのシュゴシンの保存)

ブラスト検索の結果、S g o 1 類似のタンパク質が3種のみ同定されたが、これらは全て菌類で、シゾサッカロミセス・ボンベS g o 2、サッカロミセス・セレビジエS c S g o 1、及びノイロスボラ・クラッサB 2 3 G 1. 0 6 0であった。これらのタンパク質に2つの保存領域を見出したことから、BLOCK MAKER及びMASTプログラム(Nucleic Acids Res 26,309-12(1998)、Bioinformatics 14, 48-54(1998))を使用して、2ブロックシーケンス条件下で関連性のあるタンパク質を検索した。このアプローチは、ハエ、ムシ、植物、マウス及びヒトを含む様々な真核生物からいくつかのタンパク質候補を抽出した(図9のそれぞれショウジョウバエD m、C e、シロイヌナズナA t、マウスM m及びヒトH s; 配列番号21~37参照)。特に、このリストはDrosophila M E I-S 3 3 2を含んでおり、これは以前に減数分裂における動原体性の接着を保存するために必要なタンパク質として特徴付けられたものである(Cell 83, 247-256(1995))が、類似性のスコアはマージナルである(E値=10)。リスト中、他の全てのタンパク質はカルボキシル末端基本領域において類似性のショートストレッチを示すが、それらすべてが推定コイルドコイルを含むことを除いては、第1ブロックの主なシーケンスは保存されていない。これら2つのブロック間のスペースとシーケンスはタンパク質間で分岐する。これらのブロックはM E I-S 3 3 2機能にとって重要であると以前に確認されている(Genes Dev. 12, 3843-3856(1998))ため、S g o 1の保存された領域の重要性について調査を行った。これらの類似性ブロック内で、いくつかのアミノ酸をそれぞれにアラニンに変化させ、インビボで変異体タンパク質の機能を調べた(図10)。M E I-S 3 3 2機能のために重要であるとして知られる保存された3つのアミノ酸もまた、S g o 1の機能のために必要であることを見出した(M E I-S 3 3 2における13 N、34 V及び36 S; S g o 1における29 N、50 I及び294 S)(図9の矢印部分)。さらに、第2ブロック内の他の保存されたアミノ酸(S g o 1の293 P、296 R、298 K、299 L及び300 R)も、すべてS g o 1機能にとって必要であり(図9アスタリスク)、ここで保存されていない残基297 Tは、機能を損なうことなくアラニンに変化させることができる(図9丸印)。これらの結果は、シゾサッカロミセス・ボンベS g o 1と様々な真核生物に

における他のタンパク質との間に見られるマージナルな構造的類似性が重要であることを示している。植物及び哺乳類は2つのシュゴシンに類似したタンパク質を有しており、シュゴシンの機能は分裂酵母におけるように、有糸分裂と減数分裂を完成させるために分岐した可能性がある。

【0043】

(ヒトのシュゴシン相同遺伝子のコードするタンパク質は分裂期に動原体に特異的に局在する)

ヒトのシュゴシン相同遺伝子(配列番号17、19)のコードするタンパク質(配列番号18、20;それぞれhSgo1、hSgo2)の解析を行う目的で、hSgo1、hSgo2の一部を大腸菌に発現させ、そのタンパク質をウサギに注射することによりhSgo1、hSgo2に対する抗体を作製し、かかる抗体を用いて、HeLa細胞を染色し、同時に、チューブリン抗体およびDAPIで染色し、それぞれスピンドルおよび染色体DNAで共染色して、増殖細胞とともに内在性のhSgo1、hSgo2タンパク質の発現を調べた。結果を図11に示す。図11からわかるように、分裂期の前中期(prometaphase)から中期(metaphase)にかけて、hSgo1、hSgo2いずれのシグナルも、染色体上にドット状に見られた。この免疫染色の結果により、hSgo1、hSgo2のいずれのタンパク質も、分裂期に動原体に特異的に局在することを確認した。また、分裂前中期および中期のHeLa細胞を、hSgo1あるいはhSgo2に対する抗体で染色し、同時にセントロメアタンパク質CENP-Aに対する抗体及びDAPIで共染色して、hSgo1、hSgo2タンパク質の発現を調べた。結果を図12に示す。図12からわかるように、hSgo1、hSgo2いずれのシグナルも、染色体上のCENP-Aドットに近接する場所にシグナルが見られた。このことから、hSgo1、hSgo2いずれもセントロメアタンパク質であることが明らかになった。

【0044】

(ヒトのシュゴシン相同遺伝子のコードするタンパク質は分裂期に動原体に特異的に局在し、染色体分配を進行させる上で重要な役割をしている)

hSgo1、hSgo2を標的としたRNAi実験をそれぞれ行った。結果を図13に示す。その結果、48時間後にはいずれのタンパク質の発現も有意に抑制され、図13に示されるように、分裂期(図中total)に停止した細胞が蓄積した。このことから、いずれのタンパク質も分裂期に動原体に局在し、染色体分配を進行させる上で重要な役割をしていることが強く示唆された。この蓄積は、後述するように、スピンドルチェックポイント因子Bub1をRNAiにより抑制することにより解除されたことから、hSgo1、hSgo2はセントロメアにおいて、動原体をスピンドルが正しくとらえる過程に直接的あるいは間接的に機能していることが示唆される。

【0045】

また、HeLa細胞を用いて、hSgo1を標的としたRNAi実験を行った細胞をスライドグラス状に広げ、ギムザ染色した。結果を図14に示す。RNAiを行っていないコントロールの細胞では、分裂前期の姉妹染色分体が動原体部位で強く接着しているが、RNAiを行ったhSgo1の発現を抑制した細胞では動原体部位の接着が弱くなって、離れやすくなっていることが判明した。このことから、増殖細胞の分裂期にhSgo1は、染色体の動原体部位の強い接着を維持するのに重要な役割を持つことが示された。

【0046】

Bub1を標的としたRNAi実験をそれぞれ行った。結果を図15に示す。その結果、hSgo1、hSgo2のいずれのタンパク質のセントロメアへの局在が消失した。この結果は、本発明者らが酵母で見つけた、「シュゴシンのセントロメアへの局在がBub1キナーゼに依存している」という結論が、高等生物にも保存されていることを意味する。

【0047】

次に、マウスのシュゴシン相同遺伝子(配列番号21、23)のcDNAとGFP遺伝子を融合したクローンを、レトロウイルスベクターを用いて作製し、ヒトのHeLa細胞

で発現させた。結果を図16に示す。その結果、いずれのGFP融合タンパク質も、分裂期にヒトの動原体タンパク質Bub1と共局在することがわかった。

【0048】

以上のhSgo1, hSgo2についての解析やマウスのシュゴシン相同遺伝子を用いた解析結果から、配列から予測した動物細胞のシュゴシン類似タンパク質が、機能的にも酵母のシュゴシンと保存性があることが強く示唆された。

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1】本発明のSgo1とRec8との共発現によって、姉妹染色分体は有糸分裂中に分離しないことを示す図である（参考写真1参照）。a. 内因性プロモータ（rad21+又はrec8+のための構成性染色質プロモータ、及びSgo1+のためのチアミン抑制プロモータPnmt1）によって示された遺伝子を発現するcen2-GFP株を、チアミン枯渇プレート上にストリークした。b. チアミン枯渇の後、30℃で15時間培養された、Padh1-rec8+Pnmt1-sgo1+細胞の標本。中核結合細胞においてcen2-GFPの不分離（アスタリスク）が認められる。c. cen2-GFPの不分離をカウントした（n>100）。d. Padh1-rec8+-GFP株を、Pnmt1-sgo1+を用いて、又は用いずに（b）と同様に培養した。間期及び分裂後期における細胞の標本を示す。

【図2】切断不可能なRec8の発現によって、有糸分裂において姉妹染色分体の分離が生じることを示す図である（参考写真2参照）。プラスミドpREP41-rec8-RDRD（切断不可能なRec8（Embo J 22, 5643-53(2003)）を発現する）は、cen2-GFP細胞株（+Rec8-RDRD）の染色体に取り込まれ、細胞をチアミン存在下又は非存在下でプレートにストリークした。コントロールとして、宿主系細胞（-Rec8-RDRD）を同様に培養した。Rec8-RDRDがチアミンを含まないプレートでのみ発現することに留意。チアミン枯渇の後、培養液中30℃で15時間培養された細胞の標本。

【図3】本発明のSgo1はRec8を保護するために必要とされ、それによって減数第一分裂後期にセントロメアにおいて接着が起こることを示す図である（参考写真3参照）。a. cen2-GFPでマークされたホモログの1つについて、野生型及びsgo1Δ細胞における減数分裂中の分離を観察した（n>170）。cen2-GFP正常の分離パターンが図示されている（左）。sgo1Δ細胞の標本が示されている（右）。b. 減数第一分裂（mes1Δ抑止）後の姉妹cen2-GFPドットの間隔が、sgo1Δ細胞で明らかである。c. 第一分裂後期の後期（n>30）、及び第二分裂前中期（n>100）に示された細胞で、Rec8-GFPシグナルを観察し、細胞が示す動原体性Rec8-GFPの頻度をカウントした。CFP-Atb2（α-2チューブリン）を発現させることにより、スピンドルを可視化した（Curr Biol 11, 836-45(2001)）。d. 抗GFP抗体を用いたChIPアッセイを使用して、減数第一分裂（mei4Δ抑止）の前に、抑止された細胞で指示された染色体のサイト全体におけるRec8-GFPレベルを測定した。下のパネルはシゾサッカロミセス・ポンベ染色体Iが模式的に示されており、プライマー（cnt、imr, dg, dh, lys1, mes1）を使用した。

【図4】本発明のSgo1は、減数第一分裂中に、動原体周囲領域に局在することを示す図である（参考写真4参照）。a. ディプロイドpat1-114/pat1-114細胞株（Embo J 22, 5643-53(2003)）の同調的減数分裂をサンプリングし、減数核分裂をDAP1染色によってモニターし、抗Sgo1抗体を用いたウエスタンブロット法により、Sgo1のタンパク質レベルを検出した。b. 減数細胞内の指示されたステージにおいて、Sgo1（緑色）はチューブリン（赤色）及びDAP1（4'-6'-diamidino-2-phenylindole）（青色）で対比染色した。c. mis6+-CFPを共発現するsgo1+-GFP細胞を蛍光顕微鏡下で調べた。Sgo1-GFP（緑色）及びMis6-CFP（赤色）を重ねた。d. 抗

GFP抗体によるChIPアッセイを用いて、第一分裂中期に抑止された細胞の示された染色体のサイト全体における、Sgo1-GFPレベルを測定した。mat（接合型遺伝子座におけるヘテロクロマチン領域）及びTAS（テロメア会合シーケンス）における追加的なプライマーと同時に、図2dと同様のプライマーを使用した。e. CFP-Atb2を発現してスピンドル（赤色）を可視化する示された細胞において、第一分裂中期にSgo1-GFP（緑色）を検出した。f. 増殖細胞においてRec8-HAがSgo1-FLAGを伴って又は伴わずに発現し、抽出物を抗FLAG抗体で免疫沈降した。g. 減数分裂におけるシュゴシンの作用のモデル。第一分裂後期の開始時に、シュゴシンはセパラゼによる切断から動原体性Rec8複合体を保護し、それにより減数第二分裂まで動原体性の接着を保存する。シュゴシンは第一分裂後期の間にAPC依存的に分解する。

【図5】ハプロイドpat1-114細胞株(wt)、及びcut1-206又はPrad21-slp1細胞の同調培養におけるSgo1とRec8の発現量の経時変化を示す図である（参考写真5参照）。slp1プロモータがrad21と置換されたPrad21-slp1細胞は、slp1+（APC活性化のために要求される分裂酵母CDC20ホモログ（Mol Cell Biol 17, 742-50(1997)）の発現が減数分裂の間抑制される。減数核分裂をDAP1染色によりモニターし、Sgo1、Rec8及びチューブリン（コントロール）のタンパク質レベルを、それぞれ抗Sgo1抗体、抗Rec8抗体及び抗チューブリン抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法で測定した。cut1-206細胞が正常な動原体と共にSgo1の分解を起こすが、Rec8の分解は遅れた。Prad21-slp1細胞はRec8と同様にSgo1の分解の遅れを示した。矢印はセパラゼCut1によるRec8の切断生成物を示している。

【図6】sgo1+が異所的に発現することにより、cut1-206変異体の成長が抑制されることを示す図である（参考写真6参照）。染色体sgo1+プロモータをPnmt1又はPnmt41（Pnmt1の弱いバージョン）と交換し、cut1-206温度感受性細胞の有糸分裂の成長における影響を調べた。示された細胞を、チアミン非存在下プレートにストリークし、28℃で3日間培養した。Pnmt1によってSgo1をある程度発現するcut1-206細胞は、許容温度であっても有糸分裂の成長を停止したが、cut1+細胞は正常に成長した。

【図7】動原体における有糸分裂において、本発明のSgo2は重要な役割を果たすことを示す図である（参考写真7参照）。a. 0、5又は10 µg/mlのTBZを含むYEAプレートに、示された培養体の連続的に希釈物をスポットし、30℃で3日間培養した。b. 指示された系列をYEAプレートにストリークし、30℃で3日間培養した。c. 第一分裂後期に、野生型、及びCFP-Atb2を発現してスピンドル（赤色）を可視化するbub1Δ細胞において、Sgo2-GFP（緑色）を検出した。DNAをヘキスト（青色）で染色した。分裂後期における野生型細胞についても図示した。d. sgo2+-GFP mis6+-HA細胞を固定し、抗GFP抗体及び抗HA抗体で染色した。e. ChIPアッセイを用いて、分裂前中期に抑止された細胞又は非同調性細胞で、示された染色体のサイト全体においてSgo2-GFPレベルを測定した。

【図8】本発明の出芽酵母シュゴシンScSGO1の解析結果を示す図である（参考写真8参照）。a. 増殖中の出芽酵母ScSGO1-GFPディプロイドをメタノールで固定し、DAP1で対比染色した。b. ScSGO1-Myc NDC10-HA細胞を固定し、DAP1並びにMyc及びHAに対する抗体で染色した。c. 培養液中で減数分裂を起こすScSGO1-GFPディプロイドをメタノールで固定し、DAP1で対比染色した。d. 0又は15 µg/mlのベノミルを含むYPDプレートに、示された培養体の連続的に希釈物をスポットした。e. コロニーセクティングアッセイにより、野生型(wt)及びScsgo1Δ変異体における染色体の損失を解析した。非必須染色体フラグメントの損失は、白色コロニー中の赤色セクターとな

っている。ポジティブコントロールとして *ubr1* Δ 変異体を使用した (Nature 410, 955-9(2001))。セクタリングコロニーの頻度を図下に示す ($n > 120$)。f. *Scsgo1* Δ テトラッドにおける *cenV-GFP* の分離の標本。テトラッドにおける分離パターンは、ほとんど下に示す3つのうちのいずれかに分類された。各個体群 ($n = 200$) についても示した。g. *ScSGO1-Myc* ディプロイドは同調的な減数分裂に誘発され、減数第一分裂及び減数第二分裂において、2つのホモログのうち一方をマークされた *cenV-GFP* の分離について調べた。細胞は減数第一分裂ではほとんどが還元分離パターンを起こしたが (96%, $n = 207$)、減数第二分裂では染色体不分離の発生率が高かった (34%, $n = 322$)。h. ホモログの両方を *cenV-GFP* でマークされた細胞は減数分裂に誘発され、抗チューブリン抗体及び DAPI で対比染色された。第一分裂後期の細胞を、*cenV-GFP* ドットについて検査した。*ScSGO1-Myc* 細胞は姉妹染色分体のいずれかのペアで分断された *cenV-GFP* ドットを頻繁に示したが (72%, $n = 138$)、コントロール野生型細胞は示さなかった (<2%, $n = 106$)。

【図9】種々の生物における、シュゴシン類似タンパク質のアミノ末端のコイルドコイル領域、及びカルボキシル末端基本領域のシーケンスを示す図である (参考写真9参照)。Sgo1のアミノ末端領域における1次配列はシゾサッカロミセス・ポンベ (Sgo1及びSgo2)、出芽酵母 (ScSgo1) 及びアカパンカビ (B23G1.060) に保存され、MEI-S332を含む他の種のシーケンスは保存されていないが、恐らく全てがコイルドコイルモチーフを保有している (COILS プログラム (Science 252, 1162-4(1991)) による予測)。図に示す矢印、アスタリスク及び丸印参照。

【図10】保存された領域内で生じた *sgo1* 変異体を調べた結果を示す図である (参考写真10参照)。示されたプラスミドで形質転換された *h+sgo1* Δ 及び *h-sgo1* Δ *cen2-GFP* 細胞の双方を、SPAプレートで混合し、減数第二分裂における *cen2-GFP* の分離についてモニターした。*sgo1* を発現させるために、チアミン抑制 *nm1* プロモータの弱いバージョンを帯びているプラスミド *pREP81* を使用した。プラスミド *pREP81-sgo1 (wt)* を有するコントロール細胞は減数第二分裂において80%近い分離を示すが、不分離の *sgo1* 対立遺伝子を発現する細胞は、ランダムな分離 (50%分離) を示した。非保存サイト変異体 297TAを除き、テストされた変異体はいずれも、このアッセイに *sgo1* Δ を補充しなかった。2つの独立した実験の平均が示されている ($n > 100$)。

【図11】ウサギから調製した *hSgo1* あるいは *hSgo2* に対する抗体で、HeLa細胞を染色し (緑色)、同時に、チューブリン抗体およびDAPIで染色し、それぞれスピンドル (赤色) および染色体DNA (青色) で共染色した結果を示す図である (参考写真11参照)。なお、細胞はパラホルムアルデヒドで固定した。

【図12】分裂前中期および中期のHeLa細胞を、*hSgo1* あるいは *hSgo2* に対する抗体で染色し (緑色)、同時にセントロメアタンパク質CENP-Aに対する抗体 (赤色) およびDAPI (青色) で共染色した結果を示す図である (参考写真12参照)。*hSgo1*、*hSgo2* いずれのシグナルも、染色体上のCENP-Aドットに近接する場所にシグナルが見られた。このことから、*hSgo1*、*hSgo2* いずれもセントロメアタンパク質であることが明らかになった。

【図13】*hSgo1*、*hSgo2* を標的としたRNAi実験をそれぞれ行った結果を示す図である。48時間後にはいずれのタンパク質の発現も有意に抑制され、その結果、分裂期 (図中total) に停止した細胞が蓄積した。この蓄積は、スピンドルチェックポイント因子BubR1をRNAiにより抑制することにより解除されたことから、*hSgo1*、*hSgo2* はセントロメアにおいて、動原体をスピンドルが正しくとらえる過程に直接的あるいは間接的に機能していることが示唆される。

【図14】HeLa細胞を用いて、*hSgo1* を標的としたRNAi実験を行い、細胞をスライドグラス状に広げ、ギムザ染色した結果を示す図である (参考写真13参

照)。コントロールの細胞では、姉妹染色分体が動原体部位で強く接着しているが、h S g o 1 を抑制した細胞では動原体部位の接着が弱くなって、この実験の操作によって離れやすくなっていることが判明した。

【図 1 5】B u b 1 を標的としたRNA i 実験をそれぞれ行った結果を示す図である（参考写真 1 4 参照）。(A, B) B u b 1 を標的としたRNA i 実験をそれぞれ行った結果、h S g o 1、h S g o 2 いずれのタンパク質のセントロメアへの局在が消失した。(C, D) コントロールのB u b R 1 を標的としたRNA i 実験では、h S g o 1、h S g o 2 いずれのタンパク質のセントロメアへの局在は正常であったことから、B u b 1 の結果の有意性が保証された。B u b 1 とB u b R 1 は似ているが異なるタンパク質であり、h S g o 1 とh S g o 2 のセントロメアへの局在はB u b 1 に依存するが(A, B)、B u b R 1 には依存しない(C, D) ことを示している。

【図 1 6】マウスのシュゴシン相同遺伝子（配列 2 1、2 3）のcDNAとGFP遺伝子を融合したクローンを、レトロウイルスベクターを用いて作製し、ヒトのHeLa細胞で発現させた結果を示す図である（参考写真 1 5 参照）。いずれのG F P 融合タンパク質も、分裂期にヒトの動原体タンパク質B u b 1 と共局在することがわかった。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Agency

<120> Novel centromeric protein SHUGOSHIN

<130> B44P02

<150> JP2003-401943

<151> 2003-12-01

<160> 41

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 960

<212> DNA

<213> yeast

<400> 1

atgaactttc aatttataaa ttcaaatata aacaatgaag ataaattgcc gatggagtcg	60
ttgaaaaaga aattttttaa acaaaatcgt gaaattataa aaataaatac tcagctttct	120
ataaaaatta gagaatctga aaacgaaatt caagatttga tacaagaaaa tttcactttg	180
aaaagttatt tggttaaact tgaagctcga tttcgcaatc aatctcaaac tgaggacttg	240
ttaaaaaact tctttcctga gatacaaacc attcacaaaa agatttcaca agtgcaaagt	300
ttactgaaga ttatagagaa aaagtgttca tcagatttcc tcgaagcgaa tgtaaaaagt	360
caatttacaa cctgtgaaaa taaagattcg aaagaagatt atcagatttt gcataataaa	420
cgcttggagt atgtatcatt taatgatgaa cttaaaagtc tcgaaacagg gcaaccattg	480
tattgttttc aagatttcca aaaaaaagtc catggtcctc cggctctatc tgaaaaacct	540
ggaaaatgta tattaaaaga taaaaccaat gccacgtaa acaaaatacc acaagatgag	600
gtgaattact cattgccgca aaaaaatata accatctttt caaaggaatt aaaagaaaac	660
gaatttgaat ccatcaacga gggcgaaact gaagaagaaa aggctaaaac atcaaatgtt	720
tgtgtttgta ttccttgtaa aagtgtgtaa cagataactg accttaaagg acaagcaacc	780
ggagacagct ccccatgtga ttttgaagaa tctcaaccaa ggattaatgg acgtgaaaaa	840

ctaagacgat cagtcaaagt gataaactat gcaataccca gtttgcgaac taaactacga 900

cgagactttg acttaccatc tgatagaaaa cgcaaacgac atcccagagg caaagcataa 960

<210> 2

<211> 319

<212> PRT

<213> yeast

<400> 2

Met Asn Phe Gln Phe Ile Asn Ser Asn Ile Asn Asn Glu Asp Lys Leu
1 5 10 15

Pro Met Glu Ser Leu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Gln Asn Arg Glu Ile
20 25 30

Ile Lys Ile Asn Thr Gln Leu Ser Ile Lys Ile Arg Glu Ser Glu Asn
35 40 45

Glu Ile Gln Asp Leu Ile Gln Glu Asn Phe Thr Leu Lys Ser Tyr Leu
50 55 60

Val Lys Leu Glu Ala Arg Phe Arg Asn Gln Ser Gln Thr Glu Asp Leu
65 70 75 80

Leu Lys Asn Phe Phe Pro Glu Ile Gln Thr Ile His Lys Lys Ile Ser
85 90 95

Gln Val Gln Ser Leu Leu Lys Ile Ile Glu Lys Lys Cys Ser Ser Asp
100 105 110

Phe Leu Glu Ala Asn Val Lys Ser Gln Phe Thr Thr Cys Glu Asn Lys
115 120 125

Asp Ser Lys Glu Asp Tyr Gln Ile Leu His Asn Lys Arg Leu Glu Tyr
130 135 140

Val Ser Phe Asn Asp Glu Leu Lys Ser Leu Glu Thr Gly Gln Pro Leu
145 150 155 160

Tyr Cys Phe Gln Asp Phe Gln Lys Lys Val His Gly Pro Pro Ala Leu
 165 170 175

Ser Glu Lys Pro Gly Lys Cys Ile Leu Lys Asp Lys Thr Asn Ala His
 180 185 190

Val Asn Lys Ile Pro Gln Asp Glu Val Asn Tyr Ser Leu Pro Gln Lys
 195 200 205

Asn Ile Thr Ile Phe Ser Lys Glu Leu Lys Glu Asn Glu Phe Glu Ser
 210 215 220

Ile Asn Glu Gly Glu Thr Glu Glu Glu Lys Ala Lys Thr Ser Asn Val
 225 230 235 240

Cys Val Cys Ile Pro Cys Lys Ser Ala Glu Gln Ile Thr Asp Leu Lys
 245 250 255

Gly Gln Ala Thr Gly Asp Ser Ser Pro Cys Asp Phe Glu Glu Ser Gln
 260 265 270

Pro Arg Ile Asn Gly Arg Glu Lys Leu Arg Arg Ser Val Lys Val Ile
 275 280 285

Asn Tyr Ala Ile Pro Ser Leu Arg Thr Lys Leu Arg Arg Asp Phe Asp
 290 295 300

Leu Pro Ser Asp Arg Lys Arg Lys Arg His Pro Arg Gly Lys Ala
 305 310 315

<210> 3

<211> 1944

<212> DNA

<213> yeast

<400> 3

atgtcgaaag catctctttc cccgaacgta gaagacttga aaaaaaagca aattcgacag 60

tataaggaaa ttatacgaat aagcaaggca caatcaatta gaattaaaga attgcagtta 120
gaaaatgaac ggttgctttc ggaaaatatac gatttgagga ctacagcgat aaacttggaa 180
gagcaactcg aaaccgtgca aaacgaaaac gaagaaaaca aaacaaagtt agctgcatta 240
cttaatcgat ttcatgaaga aacagataat tttttatcaa aattaagtct ttgtcagcaa 300
gaaatacaag acaccttcaa accagtggag gctaacttag cttacgatgt cgatacggat 360
tctgaagacc ttgacgagga atccgtcgtg aaagataccg aagaaataat tgagcaagct 420
cagcatgatg tttccttacg aaattttaagt ggaatagagg atgaaaatat aattgatgac 480
ggagaaactg ctataaatga acaaaaaaaaa agagaagcta atgttttttc cgacacgcaa 540
tcagcacctc agctaaaatc cggcaaagcc ctcccagctg attttgaaaa tccttacaat 600
ctatccaatt cgaaacctgt aaataataat aatgaagata gagttgaagc ggttacttct 660
gaaaataaat ctatcgattc tgctcctcag gaaaaaaatc atgaatacga aatcgttagt 720
ccaaaatcat tatccaacaa aattaataat caagcagctg cacaagaag aaccgaagaa 780
gataatgcaa atggagttgc tcaagaagaa aatgaggggtt cacaagaagc tcattttcat 840
agcagaatac aatctgatac agtaatacaa agtacacca ctaaacggaa atgggacgtt 900
gacattcaaa ataaacaaat taatctggct tctgcagcta ccaatgttac cggttatgta 960
tcggagaccg atagtcgcc caatcgcgca aactctttgg attctgctgt ctttcttgtg 1020
caatcttcaa ataaaagtaa ccgaaatggg catcatattt cagatcctaa tttaaatagc 1080
tccatatcgt tgaagtttgc gcctgaagat actgcgcata attcattaac ttcacaagag 1140
aatgttgggc ctcaggttac gacgacttct ctgtcaaata tgactgttgc tgaatctcct 1200
cgtacagaca ctccaaggga aataaacggg ttaagttaagt cttctgtcac taatgggaac 1260
gaaaaatfff ctgtagaat aatgaatgac tctaacaaaa ttggactgaa tcctaaatct 1320
tttaccgacg aagagcggga aattttaaca ctttttcgaa atcctcccat gagactgtca 1380
agtgaacctc catcttcaaa tggattttca atagcccatc ccaataattc tccgttacgt 1440
ccgccatcgc tacaaggaat attgaatgct gaagatcgac cttacgaaat tgagccgtca 1500
cgtagctcct ttgctaccaa cgatacgggc tcctataata atttgggaact tctgtcatct 1560

gtaacgaatt tgaaatcccc taatgagaac gatcgtgtga cgaaaactca gtcgcgaaga 1620
 gaaacaaaag tgaaaaggcg aagaaaagct cggattcaag aaacttctga agaaagtaca 1680
 gtagtcaatg agccaaatga aaaacctgat ggaaggagcc gaagggaacg gaaaaaggtt 1740
 aattacgctt tgcctggatt aaggacgaaa ttaagacgga atttcgattt accttcagat 1800
 catgtaaaag ctaaaaaaac gagacgtgct cctaagaact ctgagaatga ttcagctacc 1860
 aaaacagaaa ccgcaaacat tacttctgaa gcaccacta cttcagaagt aacccttgaa 1920
 aactccgaaa cccttaattt gtaa 1944

<210> 4
 <211> 647
 <212> PRT
 <213> yeast

<400> 4

Met Ser Lys Ala Ser Leu Ser Pro Asn Val Glu Asp Leu Lys Lys Lys
 1 5 10 15

Gln Ile Arg Gln Tyr Lys Glu Ile Ile Arg Ile Ser Lys Ala Gln Ser
 20 25 30

Ile Arg Ile Lys Glu Leu Gln Leu Glu Asn Glu Arg Leu Leu Ser Glu
 35 40 45

Asn Ile Asp Leu Arg Thr Thr Ala Ile Asn Leu Glu Glu Gln Leu Glu
 50 55 60

Thr Val Gln Asn Glu Asn Glu Glu Asn Lys Thr Lys Leu Ala Ala Leu
 65 70 75 80

Leu Asn Arg Phe His Glu Glu Thr Asp Asn Phe Leu Ser Lys Leu Ser
 85 90 95

Leu Cys Gln Gln Glu Ile Gln Asp Thr Phe Lys Pro Val Glu Ala Asn
 100 105 110

Leu Ala Tyr Asp Val Asp Thr Asp Ser Glu Asp Leu Asp Glu Glu Ser
 115 120 125

Val Val Lys Asp Thr Glu Glu Ile Ile Glu Gln Ala Gln His Asp Val
 130 135 140

Ser Leu Arg Asn Leu Ser Gly Ile Glu Asp Glu Asn Ile Ile Asp Asp
 145 150 155 160

Gly Glu Thr Ala Ile Asn Glu Gln Lys Lys Arg Glu Ala Asn Val Phe
 165 170 175

Ser Asp Thr Gln Ser Ala Pro Gln Leu Lys Ser Gly Lys Ala Leu Pro
 180 185 190

Ala Asp Phe Glu Asn Pro Tyr Asn Leu Ser Asn Ser Lys Pro Val Asn
 195 200 205

Asn Asn Asn Glu Asp Arg Val Glu Ala Val Thr Ser Glu Asn Lys Ser
 210 215 220

Ile Asp Ser Ala Pro Gln Glu Lys Asn His Glu Tyr Glu Ile Val Ser
 225 230 235 240

Pro Lys Ser Leu Ser Asn Lys Ile Asn Asn Gln Ala Ala Ala Gln Arg
 245 250 255

Arg Thr Glu Glu Asp Asn Ala Asn Gly Val Ala Gln Glu Glu Asn Glu
 260 265 270

Gly Ser Gln Glu Ala His Phe His Ser Arg Ile Gln Ser Asp Thr Val
 275 280 285

Ile Gln Ser Thr Pro Thr Lys Arg Lys Trp Asp Val Asp Ile Gln Asn
 290 295 300

Lys Gln Ile Asn Leu Ala Ser Ala Ala Thr Asn Val Thr Gly Tyr Val
 305 310 315 320

Ser Glu Thr Asp Ser Arg Pro Asn Arg Ala Asn Ser Leu Asp Ser Ala
325 330 335

Val Leu Leu Val Gln Ser Ser Asn Lys Ser Asn Arg Asn Gly His His
340 345 350

Ile Ser Asp Pro Asn Leu Asn Ser Ser Ile Ser Leu Lys Phe Ala Pro
355 360 365

Glu Asp Thr Ala His Asn Ser Leu Thr Ser Gln Glu Asn Val Gly Pro
370 375 380

Gln Val Thr Thr Thr Ser Leu Ser Asn Met Thr Val Ala Glu Ser Pro
385 390 395 400

Arg Thr Asp Thr Pro Arg Glu Ile Asn Gly Leu Val Asp Ser Ser Val
405 410 415

Thr Asn Gly Asn Glu Lys Phe Ser Val Glu Ile Met Asn Asp Ser Asn
420 425 430

Lys Ile Gly Leu Asn Pro Lys Ser Phe Thr Asp Glu Glu Arg Glu Ile
435 440 445

Leu Thr Leu Phe Arg Asn Pro Pro Met Arg Leu Ser Ser Glu Pro Pro
450 455 460

Ser Ser Asn Gly Phe Ser Ile Ala His Pro Asn Asn Ser Pro Leu Arg
465 470 475 480

Pro Pro Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asn Ala Glu Asp Arg Pro Tyr Glu
485 490 495

Ile Glu Pro Ser Arg Ser Ser Phe Ala Thr Asn Asp Thr Gly Ser Tyr
500 505 510

Asn Asn Leu Glu Leu Leu Ser Ser Val Thr Asn Leu Lys Ser Pro Asn
515 520 525

Glu Asn Asp Arg Val Thr Lys Thr Gln Ser Arg Arg Glu Thr Lys Val
530 535 540

Lys Arg Arg Arg Lys Ala Arg Ile Gln Glu Thr Ser Glu Glu Ser Thr
545 550 555 560

Val Val Asn Glu Pro Asn Glu Lys Pro Asp Gly Arg Ser Arg Arg Glu
565 570 575

Arg Lys Lys Val Asn Tyr Ala Leu Pro Gly Leu Arg Thr Lys Leu Arg
580 585 590

Arg Asn Phe Asp Leu Pro Ser Asp His Val Lys Ala Lys Lys Thr Arg
595 600 605

Arg Ala Pro Lys Asn Ser Glu Asn Asp Ser Ala Thr Lys Thr Glu Thr
610 615 620

Ala Asn Ile Thr Ser Glu Ala Pro Thr Thr Ser Glu Val Thr Leu Glu
625 630 635 640

Asn Ser Glu Thr Leu Asn Leu
645

<210> 5
<211> 1773
<212> DNA
<213> yeast

<400> 5
atgccgaaga gaaaaattgc tcctaacaag gaaagcagca ggcgtacggt ctcccacgat 60
gatttaacc cacaatata agaatttcaa aacctaatgg atctcgaatc gcaaaaagtg 120
gaaaacatca gacagtcgta ttcgaggcaa aactccctgc tggccaagga taactccata 180
ttaaaaatta aagttaatag cttaggaaaaa aaaataagcc agctggtaca agaaaacgtg 240

actctacgat ctaaaacctc tataagcgaa gctatctaca gggaacgggt aagtaatcaa 300
ctacaagtca ttgaaaacgg tattattcaa agatttgacg aaatttttta tatgtttgag 360
aacgtacgta aaaacgaaaa ttgcccaggt tcgagcttaa gaacaatggt gaagagaacg 420
agttccaggt caagatcatg ctcatgttca tcacccacat actcaaaaag ttacactagg 480
ttatcaaate acgagaataa cctgtcgcgt gaatcaaggt ttaacaagga cgatgggtcca 540
gatcttgagc ctaaggctaa aaaaaggaag agttctaggc ggcaatctat gtttgtatcc 600
acgagtttag aacctgaaga cgaaaccggg gaaaacgaac ccatgatgga aaattcctct 660
gtagaggtac cggcagaatc acacgagttc gcgcaagtgg aggaaacaat agatgcctta 720
aacctgaag aggaaaatag cgattctgtc agtaatttta ccaattcaat tatagaatac 780
tccataccag aggagaatcc gacagaacct gagcattcat cttctaaact agaaatattc 840
aatgacagta caaatatgct aagtacagt cgtcaaate ctttgccgtt gcctttacca 900
ggcccatccg caactttacc tactaccact agcgatgctt caacgggtta tccttcatca 960
agttcttcta ctaatttcta tccaaagacc aaaattaagc attccatgaa gccgcctagg 1020
atagaactga agaaaaaggt tattgacgaa gtcattgccc taagtaacat gagcagcaac 1080
agcgaaatat catttacgag aactagaaga actcgttgta aagctgtaga ttacactttg 1140
ccttctttta gagccaaaat gaggaggcct tcagaaaaac ttgtggatgc tactactgtg 1200
attgatatac atgatctaca ggtttccaag agaaatcggg aaacttcaca taaaaggaaa 1260
agtttatccc aagattcaat acccgacgaa ccgcaattga gagaagtcgt cgtctcaaag 1320
gattatggaa ctccaaaagg gaaaaaacg gaagatgaaa tacacgagga taccgctcat 1380
ctaagacca cttccaaca caacagcaac aacaaaaacg aaaaaaact aactagcaac 1440
aatagcccta aaaaatcgtc gcctttactt gacattaca ataatcgga gaataagaaa 1500
aagtcaaca gaactaaaa attgttcaa aatgcaattg tcaataattt atctgatgaa 1560
aatttacta cgcgaccctc caagtcgtca aagggaacca gtaataataa caacaattac 1620
aacaatttcg acaataaca ttcaaacatt aataatgtta ataataaatc tgttagcttt 1680
agactaaatg aagatgattt agcagtattt gatttatttg gaaatggtaa ggcagtgaaa 1740

catcaaccaa aaacatatcg caccaaaaaa tga

1773

<210> 6
<211> 590
<212> PRT
<213> yeast

<400> 6

Met Pro Lys Arg Lys Ile Ala Pro Asn Lys Glu Ser Ser Arg Arg Thr
1 5 10 15

Val Ser His Asp Asp Leu Thr Pro Gln Ile Gln Glu Phe Gln Asn Leu
20 25 30

Met Asp Leu Glu Ser Gln Lys Val Glu Asn Ile Arg Gln Ser Tyr Ser
35 40 45

Arg Gln Asn Ser Leu Leu Ala Lys Asp Asn Ser Ile Leu Lys Ile Lys
50 55 60

Val Asn Ser Leu Glu Lys Lys Ile Ser Gln Leu Val Gln Glu Asn Val
65 70 75 80

Thr Leu Arg Ser Lys Thr Ser Ile Ser Glu Ala Ile Tyr Arg Glu Arg
85 90 95

Leu Ser Asn Gln Leu Gln Val Ile Glu Asn Gly Ile Ile Gln Arg Phe
100 105 110

Asp Glu Ile Phe Tyr Met Phe Glu Asn Val Arg Lys Asn Glu Asn Leu
115 120 125

Pro Ser Ser Ser Leu Arg Thr Met Leu Lys Arg Thr Ser Ser Arg Ser
130 135 140

Arg Ser Cys Ser Leu Ser Ser Pro Thr Tyr Ser Lys Ser Tyr Thr Arg
145 150 155 160

Leu Ser Asn His Glu Asn Asn Leu Ser His Glu Ser Ser Phe Asn Lys
 165 170 175

Asp Asp Gly Pro Asp Leu Glu Pro Lys Ala Lys Lys Arg Lys Ser Ser
 180 185 190

Arg Arg Gln Ser Met Phe Val Ser Thr Ser Leu Glu Pro Glu Asp Glu
 195 200 205

Thr Gly Glu Asn Glu Pro Met Met Glu Asn Ser Ser Val Glu Val Pro
 210 215 220

Ala Glu Ser His Glu Ser Ala Gln Val Glu Glu Thr Ile Asp Ala Leu
 225 230 235 240

Asn Pro Glu Glu Glu Asn Ser Asp Ser Val Ser Asn Phe Thr Asn Ser
 245 250 255

Ile Ile Glu Tyr Ser Ile Pro Glu Glu Asn Pro Thr Glu Pro Glu His
 260 265 270

Ser Ser Ser Lys Leu Glu Ile Phe Asn Asp Ser Thr Asn Met Leu Ser
 275 280 285

Thr Val Pro Ser Asn Pro Leu Pro Leu Pro Leu Pro Gly Pro Ser Ala
 290 295 300

Thr Leu Pro Thr Thr Thr Ser Asp Ala Ser Thr Val Tyr Pro Ser Ser
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Thr Asn Ser His Pro Lys Thr Lys Ile Lys His Ser Met
 325 330 335

Lys Pro Pro Arg Ile Glu Leu Lys Lys Lys Val Ile Asp Glu Val Met
 340 345 350

Pro Val Ser Asn Met Ser Ser Asn Ser Glu Ile Ser Phe Thr Arg Thr
 355 360 365

Arg Arg Thr Arg Gly Lys Ala Val Asp Tyr Thr Leu Pro Ser Leu Arg
370 375 380

Ala Lys Met Arg Arg Pro Ser Glu Lys Leu Val Asp Ala Thr Thr Val
385 390 395 400

Ile Asp Ile His Asp Leu Gln Val Ser Lys Arg Asn Arg Glu Thr Ser
405 410 415

His Lys Arg Lys Ser Leu Ser Gln Asp Ser Ile Pro Asp Glu Pro Gln
420 425 430

Leu Arg Glu Val Val Val Ser Lys Asp Tyr Gly Thr Pro Lys Gly Lys
435 440 445

Lys Thr Glu Asp Glu Ile His Glu Asp Thr Ala His Leu Met Thr Thr
450 455 460

Ser Asn Asn Asn Ser Asn Asn Lys Asn Glu Lys Lys Leu Thr Ser Asn
465 470 475 480

Asn Ser Pro Lys Lys Ser Ser Pro Leu Leu Asp Ile Thr Asn Lys Ser
485 490 495

Glu Asn Lys Lys Lys Ser Thr Arg Thr Lys Lys Leu Phe Lys Asn Ala
500 505 510

Ile Val Asn Asn Leu Ser Asp Glu Asn Ser Thr Thr Arg Pro Ser Lys
515 520 525

Ser Ser Lys Gly Thr Ser Asn Asn Asn Asn Asn Tyr Asn Asn Phe Asp
530 535 540

Asn Asn Asn Ser Asn Ile Asn Asn Val Asn Asn Lys Ser Val Ser Phe
545 550 555 560

Arg Leu Asn Glu Asp Asp Leu Ala Val Phe Asp Leu Phe Gly Asn Gly
565 570 575

Lys Ala Val Lys His Gln Pro Lys Thr Tyr Arg Thr Lys Lys
580 585 590

<210> 7

<211> 2325

<212> DNA

<213> Neurospora crassa

<400> 7

```

atggcccgcc tcaacgaaca agccatgtcg tctgtcgcgt tgtcaacaga caatctcgag      60
ctcctgcgta ggaagttcct cagacaaaac agagatattg ctcgagtcaa ttccacacag      120
tcactccgta tccgtgggtt ggagaatgaa tgcgctcggt tgctgtcgga aaacctcgaa      180
ctccgtggtc aggtcttgcg cctcgaaaag gagctccaag acaacgctgc gcgaagggtg      240
gccgatcatg cgctcgaggt caaggccaag atggagacgc agttggcgga actcagttcg      300
ctgctggcaa gcttagggga gccgccctcg aagcggcgcc tttcagaaga gaggcgatac      360
gcgcagcctc gaccgagcgt tcaccggagc cctcccttac gaagagcacg ccaggaggcc      420
gaccaggaac tactggctga gcaggaagga aggctaccgc cgatatacga gaacaagacg      480
tatgcgcgag ccacaatgaa cagtgaagaa atcctggcgc tgtgcatgca ggcagacgat      540
tcgaatgact cgccagatat cggaccgccg ccagtatcta ggtttgtcga ggatgatatg      600
gtcatacctt gttcaccatc gccaaacaag aacgccgagg ctgaagaaac ggaaactacc      660
gagcaagtgg aagagagccc tagggctctt caagtaccgc cgtcattatc gccgcctaaa      720
ctggactacg acaggagacc aaacatgata ctattcagcc caccxaaaga atcgagagtg      780
gcagaaccct caaaatgtt cagtccccct ccgatggaac caccgaaaca gtccacatcg      840
gctgtaccga gtgagacaat acgagcaggc ctcaagcgaa agttgaacgg cgacaaccaa      900
aacgaacca acaaggcaac caagcttcaa caaggaaagg agaatggcaa tgagactggg      960
atcaagaaag gactctctgc ccgcgacccg cacaagagga aaagcatcaa agagaccgca     1020
acgaaaccga gagccccgct gtcagcaaag agcacgaacg agcacattgt ctctccgaag     1080

```

aagccggcga agccccacca agtggccgac gattttaagc cggatgaaggt gcacaaggcg 1140
tcaaagggtta aagagaaagt cgacctgccc gtcctcgaca agaagtcagc agtagaagaa 1200
acgcaaggaa attctacgtc ggcatcacg aaagtcgaga tcctcccgcc ggctctggaa 1260
cctactcctg aagttgcaga gattcctgaa accgatattc tgatcacacc tggaacacca 1320
gagcgcgcct ctgaaagcac tgttgtgacc cacgataccc cgccgccagc ccacattica 1380
tccaatggag agacgtcgcg gcctagcagg cgtgctagag cggctatcag ctatacagag 1440
cccaatctgc gcgacaagat gcgacgaccg accaaagagc tctttgatgc cgtttctggg 1500
gagggcaagt tcctacacag gccgacatcg caacagcaac agcagcaacg caagggcgac 1560
gagtcagcac cgacgtcagt tagcaaggctc aaggtcgagc catcgccggc ggtggatata 1620
agtagtctga ccagcagtgc gctgtttgaa aaagagaagg agaaggaacc acagccggat 1680
gaaggaatat tatctcaaa cggcatcctc ccaagctcag tagacctggg aaggagaaga 1740
cgcgccatcat ctttctctac tgcagccccct gcaatgacaa ttccttcggt ccaagaacaa 1800
tcaactctaa acctcccagc cgccggacgag accgatgaaa acgccgcggt cgaggctcag 1860
attcagaagg agctgagtaa tagtattaca acacggccca ggggtggaaa ggggaggcaa 1920
tcaatgagcc gttccgtacc cacgatccca acagaaaatt acgagcacga ggacgcacaa 1980
ctctcgacga actcagcctc ggtggatctt tacgactitg ctagttgtgc gtctccggat 2040
agcgcagcac ccagctaga agcgactacc ggcgatgttc ctgttaataa gaaggcacc 2100
aaaggttcaa gaagagcgtc ctcagctgct tcgaccgaga caacagcaac agcatccgca 2160
aagccaagat cttcccga aaagggttcg atgctgggtgc cgaagaaaag cttgtgggct 2220
gaagagttag cgcaggagga agaggatgag gaagatgtcg gcaatgacag tggcgggtcc 2280
ttgtccaagg ggagggcctc gaggaggaga agcatgatgc tttga 2325

<210> 8
<211> 774
<212> PRT
<213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Ala Arg Leu Asn Glu Gln Ala Met Ser Ser Val Ala Leu Ser Thr
1 5 10 15

Asp Asn Leu Glu Leu Leu Arg Arg Lys Phe Leu Arg Gln Asn Arg Asp
20 25 30

Ile Ala Arg Val Asn Ser Thr Gln Ser Leu Arg Ile Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Asn Glu Cys Ala Arg Leu Leu Ser Glu Asn Leu Glu Leu Arg Gly Gln
50 55 60

Val Leu Arg Leu Glu Lys Glu Leu Gln Asp Asn Ala Ala Arg Arg Val
65 70 75 80

Ala Asp His Ala Leu Glu Val Lys Ala Lys Met Glu Thr Gln Leu Ala
85 90 95

Glu Leu Ser Ser Leu Leu Ala Ser Leu Gly Glu Pro Pro Ser Lys Arg
100 105 110

Arg Leu Ser Glu Glu Arg Arg Tyr Ala Gln Pro Arg Pro Ser Val His
115 120 125

Arg Ser Pro Pro Leu Arg Arg Ala Arg Gln Glu Ala Asp Gln Glu Leu
130 135 140

Leu Ala Glu Gln Glu Gly Arg Leu Pro Pro Ile Tyr Glu Asn Lys Thr
145 150 155 160

Tyr Ala Arg Ala Thr Met Asn Ser Glu Glu Ile Leu Ala Leu Cys Met
165 170 175

Gln Ala Asp Asp Ser Asn Asp Ser Pro Asp Ile Gly Pro Pro Pro Val
180 185 190

Ser Arg Phe Val Glu Asp Asp Met Val Ile Pro Cys Ser Pro Ser Pro
195 200 205

Asn Lys Asn Ala Glu Ala Glu Glu Thr Glu Thr Thr Glu Gln Val Glu
210 215 220

Glu Ser Pro Arg Ala Leu Gln Val Pro Pro Ser Leu Ser Pro Pro Lys
225 230 235 240

Leu Asp Tyr Asp Arg Arg Pro Asn Met Ile Leu Phe Ser Pro Pro Lys
245 250 255

Glu Ser Arg Val Ala Glu Pro Ser Lys Met Phe Ser Pro Pro Pro Met
260 265 270

Glu Pro Pro Lys Gln Ser Thr Ser Ala Val Pro Ser Glu Thr Ile Arg
275 280 285

Ala Gly Leu Lys Arg Lys Leu Asn Gly Asp Asn Gln Asn Glu Pro Asn
290 295 300

Lys Ala Thr Lys Leu Gln Gln Gly Lys Glu Asn Gly Asn Glu Thr Gly
305 310 315 320

Ile Lys Lys Gly Leu Ser Ala Arg Asp Pro His Lys Arg Lys Ser Ile
325 330 335

Lys Glu Thr Ala Thr Lys Pro Arg Ala Pro Leu Ser Ala Lys Ser Thr
340 345 350

Asn Glu His Ile Val Ser Pro Lys Lys Pro Ala Lys Pro His Gln Val
355 360 365

Ala Asp Asp Phe Lys Pro Val Lys Val His Lys Ala Ser Lys Gly Lys
370 375 380

Glu Lys Val Asp Leu Pro Ala Pro Asp Lys Lys Ser Ala Val Glu Glu
385 390 395 400

Thr Gln Gly Asn Ser Thr Ser Ala Phe Thr Lys Val Glu Ile Leu Pro
405 410 415

Pro Ala Leu Glu Pro Thr Pro Glu Val Ala Glu Ile Pro Glu Thr Asp
420 425 430

Ile Leu Ile Thr Pro Gly Thr Pro Glu Arg Ala Ser Glu Ser Thr Val
435 440 445

Val Thr His Asp Thr Pro Pro Pro Ala His Ile Ser Ser Asn Gly Glu
450 455 460

Thr Ser Arg Pro Ser Arg Arg Ala Arg Ala Ala Ile Ser Tyr Thr Glu
465 470 475 480

Pro Asn Leu Arg Asp Lys Met Arg Arg Pro Thr Lys Glu Leu Phe Asp
485 490 495

Ala Val Ser Gly Glu Gly Lys Phe Leu His Arg Pro Thr Ser Gln Gln
500 505 510

Gln Gln Gln Gln Arg Lys Gly Asp Glu Ser Ala Pro Thr Ser Val Ser
515 520 525

Lys Val Lys Val Glu Pro Ser Pro Ala Val Asp Ile Ser Ser Leu Thr
530 535 540

Ser Ser Ala Leu Phe Glu Lys Glu Lys Glu Lys Glu Pro Gln Pro Asp
545 550 555 560

Glu Gly Ile Leu Ser Pro Asn Gly Ile Leu Pro Ser Ser Val Asp Leu
565 570 575

Gly Arg Arg Arg Arg Ala Ser Ser Phe Ser Thr Ala Ala Pro Ala Met
580 585 590

Thr Ile Pro Ser Val Gln Glu Gln Ser Thr Leu Asn Leu Pro Ala Ala
595 600 605

Asp Glu Thr Asp Glu Asn Ala Ala Val Glu Ala Gln Ile Gln Lys Glu
610 615 620

Leu Ser Asn Ser Ile Thr Thr Arg Pro Arg Gly Gly Lys Gly Arg Gln
625 630 635 640

Ser Met Ser Arg Ser Val Pro Thr Ile Pro Thr Glu Asn Tyr Glu His
645 650 655

Glu Asp Ala Gln Leu Ser Thr Asn Ser Ala Ser Val Asp Leu Tyr Asp
660 665 670

Phe Ala Ser Cys Ala Ser Pro Asp Ser Ala Ala Pro Gln Leu Glu Ala
675 680 685

Thr Thr Gly Asp Val Pro Val Asn Lys Lys Ala Pro Lys Gly Ser Arg
690 695 700

Arg Ala Ser Ser Ala Ala Ser Thr Glu Thr Thr Ala Thr Ala Ser Ala
705 710 715 720

Lys Pro Arg Ser Ser Arg Lys Arg Ala Ser Met Leu Val Pro Lys Lys
725 730 735

Ser Leu Trp Ala Glu Glu Leu Ala Gln Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp
740 745 750

Val Gly Asn Asp Ser Gly Gly Ser Leu Ser Lys Gly Arg Ala Ser Arg
755 760 765

Arg Arg Ser Met Met Leu
770

<210> 9
<211> 1671
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 9
atggttcgag cgacggttct gaatgtcggg gatcacgcca gtgaagggtg gcgtactaac 60
aaagctaaag gagagaaaat ggttctggaa cctccgatga acagtgcaca aagacgaaag 120
ttgggggata ttactaattt gcagaatcag aagaatctaa tgaatcaggg agcgaagcat 180
cagcaacaag ctatattaat ctcttctaaa gaaaacgctg aaaatcttca aaaggcactg 240
agaaattctt ctgaaaacac aaagctgatg aaagtcgtca tggagagaga tggaatcaaa 300
agtgatctga agaaacttag gattgaattt cagaagggtc aagaacagaa tttgctactt 360
gcccaggcta acactcgtat cttggcgctg aaggctactt agcacgaact tggttgcaag 420
aatggggttag tcatggccag gaaaatgctg ctttaaggctc aagcaaagtc ttgtgggtggg 480
gcttgcaaaa cctttcagcc aaatgatgca gatcatgagc atgcttccgg gagctccaac 540
gctaactcat tgcaaagaaa tgagaaagcc aacagtaaaa ggagagtttc tggaaggaag 600
aatcccgcga attccgaggt attagatata attggcagat cgggagagac atgtcagatg 660
gaagacaaca ttgacaaca gaagttggtc tctgatagtg acaatgatgc tgaaaaccat 720
ataaatgaca atgtccaaag caaaagatat tgtgcaggaa gacagagtag cagttctaag 780
actcgagaag ccagccaaac agaaaccttg caaaagggtg ttgacgcaa agaaattaag 840
ggggatgcaa ggttttcttt gacaaagcat tctgactggg taaaatctca agaacctgag 900
ccatctgaaa gcctatacga gtcaagggtc cctttgagaa ggcgttctgc ccggttaaaa 960
tctcaagaac ctgagccatc tgaaagcttc catgactcaa tagagacaac caagaggagg 1020
aggtcggcaa taaggtctgc tatgtttaat atccaagagc tgggcgttat tcaaaacttg 1080
aacggtttac ctgatgatca agagattgct gcaaaggcca gatgctctgc acgtgaacag 1140
tctaccgggt ctaaaccga agcagtagaa ccacatgaca caaaagagat aatcgggaaa 1200
agcaggatat ctttgagaag acagtctgcg aggtttaatt tccaagagct gggcgtgact 1260
gaaaacttga atggtccaca tgatgatcaa acgattgctg caaatgccag atgctgtgca 1320
agtgaacagt ctatcgggtc taaaccgaa gcagtagaac cacatgacat tgaagagaga 1380
atcgggaaaa tcagagtctc ttcaagaaga caatctgcaa acattgaaac tccgagagcc 1440

atcaaagaac ctgcaaattcc gcctttgcat gatgacaatg ttgaggagtc tagtcagata 1500
tcatgttcag tttcaatgga gcttaaaaga gaatcaaaga agaaaccaac aggcgacgaa 1560
tcagaggaaa tgagaaaaac aactgttgga agaccttcaa ggcaagctgc tgaaaaaatc 1620
aaatcgtaca aggaaccttc acttaaggag aagatgcgag ggggcttctg a 1671

<210> 10

<211> 556

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Val Arg Ala Thr Val Leu Asn Val Gly Asp His Ala Ser Glu Gly
1 5 10 15

Val Arg Thr Asn Lys Ala Lys Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Pro Pro
20 25 30

Met Asn Ser Ala Gln Arg Arg Lys Leu Gly Asp Ile Thr Asn Leu Gln
35 40 45

Asn Gln Lys Asn Leu Met Asn Gln Gly Ala Lys His Gln Gln Gln Ala
50 55 60

Ile Leu Ile Ser Ser Lys Glu Asn Ala Glu Asn Leu Gln Lys Ala Leu
65 70 75 80

Arg Asn Ser Ser Glu Asn Thr Lys Leu Met Lys Val Val Met Glu Arg
85 90 95

Asp Gly Ile Lys Ser Asp Leu Lys Lys Leu Arg Ile Glu Phe Gln Lys
100 105 110

Val Gln Glu Gln Asn Leu Leu Leu Ala Gln Ala Asn Thr Arg Ile Leu
115 120 125

Ala Leu Lys Val Leu Gln His Glu Leu Gly Cys Lys Asn Gly Leu Val
130 135 140

Met Ala Arg Lys Met Leu Leu Lys Ala Gln Ala Asn Ala Cys Gly Gly
145 150 155 160

Ala Cys Lys Thr Phe Gln Pro Asn Asp Ala Asp His Glu His Ala Ser
165 170 175

Gly Ser Ser Asn Ala Asn Ser Leu Gln Arg Asn Glu Lys Ala Asn Ser
180 185 190

Lys Arg Arg Val Ser Gly Arg Lys Asn Pro Ala Asn Ser Glu Val Leu
195 200 205

Asp Ile Ile Gly Arg Ser Gly Glu Thr Cys Gln Met Glu Asp Asn Ile
210 215 220

Asp Asn Lys Lys Leu Val Ser Asp Ser Asp Asn Asp Ala Glu Asn His
225 230 235 240

Ile Asn Asp Asn Val Gln Ser Lys Arg Tyr Cys Ala Gly Arg Gln Ser
245 250 255

Ser Ser Ser Lys Thr Arg Glu Ala Ser Gln Thr Glu Thr Leu Gln Lys
260 265 270

Val Val Asp Ala Lys Glu Ile Lys Gly Asp Ala Arg Phe Ser Leu Thr
275 280 285

Lys His Ser Asp Trp Leu Lys Ser Gln Glu Pro Glu Pro Ser Glu Ser
290 295 300

Leu Tyr Glu Ser Arg Phe Pro Leu Arg Arg Arg Ser Ala Arg Leu Lys
305 310 315 320

Ser Gln Glu Pro Glu Pro Ser Glu Ser Phe His Asp Ser Ile Glu Thr
325 330 335

Thr Lys Arg Arg Arg Ser Ala Ile Arg Ser Ala Met Phe Asn Ile Gln
340 345 350

Glu Leu Gly Val Ile Gln Asn Leu Asn Gly Leu Pro Asp Asp Gln Glu
355 360 365

Ile Ala Ala Lys Ala Arg Cys Ser Ala Arg Glu Gln Ser Thr Gly Ser
370 375 380

Lys Pro Glu Ala Val Glu Pro His Asp Thr Lys Glu Ile Ile Gly Lys
385 390 395 400

Ser Arg Ile Ser Leu Arg Arg Gln Ser Ala Arg Phe Asn Phe Gln Glu
405 410 415

Leu Gly Val Thr Glu Asn Leu Asn Gly Pro His Asp Asp Gln Thr Ile
420 425 430

Ala Ala Asn Ala Arg Cys Cys Ala Ser Glu Gln Ser Ile Gly Ser Lys
435 440 445

Pro Glu Ala Val Glu Pro His Asp Ile Glu Glu Arg Ile Gly Lys Ile
450 455 460

Arg Val Ser Ser Arg Arg Gln Ser Ala Asn Ile Glu Thr Pro Arg Ala
465 470 475 480

Ile Lys Glu Pro Ala Asn Pro Pro Leu His Asp Asp Asn Val Glu Glu
485 490 495

Ser Ser Gln Ile Ser Cys Ser Val Ser ~~Met~~ Glu Leu Lys Arg Glu Ser
500 505 510

Lys Lys Lys Pro Thr Gly Asp Glu Ser Glu Glu Met Arg Lys Thr Thr
515 520 525

Val Gly Arg Pro Ser Arg Gln Ala Ala Glu Lys Ile Lys Ser Tyr Lys
530 535 540

Glu Pro Ser Leu Lys Glu Lys Met Arg Gly Gly Phe
 545 550 555

<210> 11
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 11

```

atggataaag aagagacgca gcagaaggaa aatatgctat tctcttccca ggaatatgct      60
gcaaagcttc aaaaggcatt tcctcttcac tttaatcttg aaaacatgac actgatgaaa      120
gctctagcac accgaaataa actcgtcgag ttgagcggta ttgagattca gaaactgagg      180
attaacttac ggagtgtgca ggaaaagaat ttgcagcttg ctcaggcaaa cagtcagatg      240
ttagcgctca aggatctcca gcatgaactt ggctgcaaga atgctttact taaagtcaag      300
aaacatcttg aggagcaagt acttcacgt acacatcatg aatcgaaaga caaggtttca      360
gcaagcgctt ctgatgggga ttgcaaatcc tttcaggtgc atgacataaa acataaagat      420
accaagagaa agcgaacaac aaggataaaa tcttcagtaa gtgccgacgt caagccaata      480
cctgtgaatg attctaacag taaagctaac cgtaaaagaa gagtttctgg agtaatagat      540
actactggta ttcccgaaga gatctgtcag actgaagatg acattgataa gggggttgtc      600
tctcgagggg taaaccaaga tattgacaat gttgtcaaca agaagtttgt tcctgatgca      660
gcaaaccgga taaaagagag tgtgcatcgc aagaggcaat gtacacgaag gcaatctacc      720
agatttgatg ttcaagaaac taaacaaacg gaaaagttgc ttgagatgga tggtgccaaa      780
gaaagtaaag aaaccgcaag cttctctttg agaagacggt ctgctcggtt aaggcacgaa      840
gaagctgaac catgtaaaag cttacatgag ggagacgaag tcaggagagac aatcaagagg      900
agaagagtct ctttaagact gtctgcaagg tttgatatac aagaaccgca tgtgactgaa      960
acctcgaatg ctgacgatgc aagaagcata gtaatcgaag aatctgctgg atcaagatcg     1020
gaatctgtag aaccatccga aagcaggcat gaaacaaaag agataacccg gaaacgcagt     1080
ttctcaacga gaagacaatc aacaaagggt aaatctcaaa ccgatgaagc cattaaagaa     1140

```

atagcgacag acccatcttt ggtcaacacc atagttcaag agtgtgatca ggaaacagaa 1200
tcaaaggata agcctaaagc tgatgaaaac gaagggatga caagaagatc atctgtggga 1260
agaccatcga gacatgccgc agagaaagtc caatcataca gagaagtctc acttagagta 1320
aagatgcgac gaaaatgcta a 1341

<210> 12
<211> 446
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 12

Met Asp Lys Glu Glu Thr Gln Gln Lys Glu Asn Met Leu Phe Ser Ser
1 5 10 15

Gln Glu Tyr Ala Ala Lys Leu Gln Lys Ala Phe Pro Leu His Phe Asn
20 25 30

Leu Glu Asn Met Thr Leu Met Lys Ala Leu Ala His Arg Asn Lys Leu
35 40 45

Val Glu Leu Ser Gly Ile Glu Ile Gln Lys Leu Arg Ile Asn Leu Arg
50 55 60

Ser Val Gln Glu Lys Asn Leu Gln Leu Ala Gln Ala Asn Ser Gln Met
65 70 75 80

Leu Ala Leu Lys Asp Leu Gln His Glu Leu Gly Cys Lys Asn Ala Leu
85 90 95

Leu Lys Val Lys Lys His Leu Glu Glu Gln Val Leu Pro Arg Thr His
100 105 110

His Glu Ser Lys Asp Lys Val Ser Ala Ser Ala Ser Asp Gly Asp Cys
115 120 125

Lys Ser Phe Gln Val His Asp Ile Lys His Lys Asp Thr Lys Arg Lys
130 135 140

Arg Thr Thr Arg Ile Lys Ser Ser Val Ser Ala Asp Val Lys Pro Ile
145 150 155 160

Pro Val Asn Asp Ser Asn Ser Lys Ala Asn Arg Lys Arg Arg Val Ser
165 170 175

Gly Val Ile Asp Thr Thr Gly Ile Pro Glu Glu Ile Cys Gln Thr Glu
180 185 190

Asp Asp Ile Asp Lys Gly Val Val Ser Arg Gly Val Asn Gln Asp Ile
195 200 205

Asp Asn Val Val Asn Lys Lys Phe Val Pro Asp Ala Ala Asn Pro Val
210 215 220

Lys Glu Ser Val His Arg Lys Arg Gln Cys Thr Arg Arg Gln Ser Thr
225 230 235 240

Arg Phe Asp Val Gln Glu Thr Lys Gln Thr Glu Lys Leu Leu Glu Met
245 250 255

Asp Gly Ala Lys Glu Ser Lys Glu Thr Ala Ser Phe Ser Leu Arg Arg
260 265 270

Arg Ser Ala Arg Leu Arg His Glu Glu Ala Glu Pro Cys Lys Ser Leu
275 280 285

His Glu Gly Asp Glu Val Arg Glu Thr Ile Lys Arg Arg Arg Val Ser
290 295 300

Leu Arg Leu Ser Ala Arg Phe Asp Ile Gln Glu Pro His Val Thr Glu
305 310 315 320

Thr Ser Asn Ala Asp Asp Ala Arg Ser Ile Val Ile Glu Glu Ser Ala
325 330 335

Gly Ser Arg Ser Glu Ser Val Glu Pro Ser Glu Ser Arg His Glu Thr
340 345 350

Lys Glu Ile Thr Arg Lys Arg Ser Phe Ser Thr Arg Arg Gln Ser Thr
355 360 365

Lys Gly Lys Ser Gln Thr Asp Glu Ala Ile Lys Glu Ile Ala Thr Asp
370 375 380

Pro Ser Leu Val Asn Thr Ile Val Gln Glu Cys Asp Gln Glu Thr Glu
385 390 395 400

Ser Lys Asp Lys Pro Lys Ala Asp Glu Asn Glu Gly Met Thr Arg Arg
405 410 415

Ser Ser Val Gly Arg Pro Ser Arg His Ala Ala Glu Lys Val Gln Ser
420 425 430

Tyr Arg Glu Val Ser Leu Arg Val Lys Met Arg Arg Lys Cys
435 440 445

<210> 13
<211> 1554
<212> DNA
<213> mouse

<400> 13
atggctaagg aaaggtgtca gaaaaggtcc ttccaagata cccttgaaga cattaagaat 60
cgaatgaaag aaaaaaggaa taaaaatttg gcggggattg ggaaacgcaa gtcctttatt 120
gttgaccgg gccaaagtacc cactaacact gctacactac tgagatatta ccaagataac 180
aacaggttgt tagtcttggc ttgggaaaat gagaaatcca aagtgagaga agcacaggat 240
gtcatcctgc aactgagaaa agaattgctac taccttactt gtcagctgta tgcattgaaa 300
gagaagctaa cttcccgaca aagtgaagaa actactcaga actggaaagg acgtccctca 360
gacgtggtct ccagcattga caatacgacc agggacttgt cagggaagtc cttacagcaa 420
attgctgttg aagaaactga ttgtccttac caaaccacag aaccaagtcc tgctgttact 480

ccagagacac agggttgcga ttttgattca ggtaaagttg agtctactga tgaagtctta 540
 cccagaacta tatctatccg tcgccattta aggaaagatt ttagtaatat aagccactcc 600
 acgactttgg aggattgtaa agccagtcca agagtggcac agtctctgga agttaaagga 660
 agtagatgta gagaagtaac cgtaaccctg cacagacttg aaaatgtttg tctgtggaac 720
 aaagaccaaa ttagcttatg ttctagactg attaaccag caaagattac tgaacagaa 780
 gtcattttat catctaaacc tgaacaaata gaaagcaagc ataaacgtgc acgaaaaaga 840
 agagcagagc aaagaagaac caagcagaga tgcaaatcaa aatcctcatt gaggagtaag 900
 gggaacaaaa acaaagataa gcagggttta cccctacta cactggatgg aggtattggt 960
 tcctgtgatg cttacgattt taatctaaaa gggacgggtcc accccacccc tttccgacaa 1020
 aaaatgaaca atggctgcaa caaagaaacg gatagcagca actcagaagt gactgacctc 1080
 gaatgcagta cctctgagga tgagtctgat gacctctacc tgcctccctc caagcgcttg 1140
 cgagactaca gagagtcaga gagagcagtt accaggcctc ggtctaaaag aggacttcag 1200
 taccagatg ggaaagagag gaaggagggtg ctgccatcta cagctcctac tggtatccca 1260
 cctgagactc aagagtcacc tcgtttagc ctaaaggatg tcaccaatat cctgcagtgt 1320
 cctagagtga agatcaggaa gccttctctg cctccaaagc ggcgtgaaga cagcccagca 1380
 gtggctctga ctaaacgcag gtgtagcacc atcaaaagct ataaagagcc aacactcgct 1440
 tcaaagctaa gaagagggga ccctttcacg gacttgtgtt tcttgaattc tcctattttc 1500
 aagcagaaaa ggggtatgag atgtcctaaa agaagaacca agcaaacaca gtaa 1554

<210> 14
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> mosue

<400> 14

Met Ala Lys Glu Arg Cys Gln Lys Arg Ser Phe Gln Asp Thr Leu Glu
 1 5 10 15

Asp Ile Lys Asn Arg Met Lys Glu Lys Arg Asn Lys Asn Leu Ala Gly
 20 25 30

Ile Gly Lys Arg Lys Ser Phe Ile Val Ala Pro Gly Gln Val Pro Thr
35 40 45

Asn Thr Ala Thr Leu Leu Arg Tyr Tyr Gln Asp Asn Asn Arg Leu Leu
50 55 60

Val Leu Ala Leu Glu Asn Glu Lys Ser Lys Val Arg Glu Ala Gln Asp
65 70 75 80

Val Ile Leu Gln Leu Arg Lys Glu Cys Tyr Tyr Leu Thr Cys Gln Leu
85 90 95

Tyr Ala Leu Lys Glu Lys Leu Thr Ser Arg Gln Ser Glu Glu Thr Thr
100 105 110

Gln Asn Trp Lys Gly Arg Pro Ser Asp Val Val Ser Ser Ile Asp Asn
115 120 125

Thr Thr Arg Asp Leu Ser Gly Lys Ser Leu Gln Gln Ile Ala Val Glu
130 135 140

Glu Thr Asp Cys Pro Tyr Gln Thr Thr Glu Pro Ser Pro Ala Val Thr
145 150 155 160

Pro Glu Thr Gln Gly Cys Asp Phe Asp Ser Gly Lys Val Glu Ser Thr
165 170 175

Asp Glu Val Leu Pro Arg Thr Ile Ser Ile Arg Arg His Leu Arg Lys
180 185 190

Asp Phe Ser Asn Ile Ser His Ser Thr Thr Leu Glu Asp Cys Lys Ala
195 200 205

Ser Pro Arg Val Ala Gln Ser Leu Glu Val Lys Gly Ser Arg Cys Arg
210 215 220

Glu Val Thr Val Thr Leu His Arg Leu Glu Asn Val Cys Leu Trp Asn
225 230 235 240

Lys Asp Gln Ile Ser Leu Cys Ser Arg Leu Ile Asn Pro Ala Lys Ile
245 250 255

Thr Glu Thr Glu Val Ile Leu Ser Ser Lys Pro Glu Gln Ile Glu Ser
260 265 270

Lys His Lys Arg Ala Arg Lys Arg Arg Ala Glu Gln Arg Arg Thr Lys
275 280 285

Gln Arg Cys Lys Ser Lys Ser Ser Leu Arg Ser Lys Gly Asn Lys Asn
290 295 300

Lys Asp Lys Gln Gly Leu Pro Pro Thr Thr Leu Asp Gly Gly Ile Gly
305 310 315 320

Ser Cys Asp Ala Tyr Asp Phe Asn Leu Lys Gly Thr Val His Pro Thr
325 330 335

Pro Phe Arg Gln Lys Met Asn Asn Gly Cys Asn Lys Glu Thr Asp Ser
340 345 350

Ser Asn Ser Glu Val Ser Asp Leu Glu Cys Ser Thr Ser Glu Asp Glu
355 360 365

Ser Asp Asp Leu Tyr Leu Pro Pro Ser Lys Arg Leu Arg Asp Tyr Arg
370 375 380

Glu Ser Glu Arg Ala Val Thr Arg Pro Arg Ser Lys Arg Gly Leu Gln
385 390 395 400

Tyr Pro Asp Gly Lys Glu Arg Lys Glu Val Leu Pro Ser Thr Ala Pro
405 410 415

Thr Gly Ile Pro Pro Glu Thr Gln Glu Ser Pro Arg Cys Ser Leu Lys
420 425 430

Asp Val Thr Asn Ile Leu Gln Cys Pro Arg Val Lys Ile Arg Lys Pro
 435 440 445

Ser Leu Pro Pro Lys Arg Arg Glu Asp Ser Pro Ala Val Ala Leu Thr
 450 455 460

Lys Arg Arg Cys Ser Thr Ile Lys Ser Tyr Lys Glu Pro Thr Leu Ala
 465 470 475 480

Ser Lys Leu Arg Arg Gly Asp Pro Phe Thr Asp Leu Cys Phe Leu Asn
 485 490 495

Ser Pro Ile Phe Lys Gln Lys Arg Gly Met Arg Cys Pro Lys Arg Arg
 500 505 510

Thr Lys Gln Thr Gln
 515

<210> 15
 <211> 3495
 <212> DNA
 <213> mouse

<400> 15
 atggagtacc cagggataaa agttgacact gttacctctg gaattcagag acgagtgaag 60
 ggcagaattg caaagacaaa tttgaatggt tctcttgctt caaagatcaa agcaaaaata 120
 ttaaacaatt cttctatttt caagatctct ctaaagcaca acaacagagc attagcgcgg 180
 gcccttagta aagagaaaga gaattctcga agaattacta ccgaaaagat gcaattacag 240
 aaagaagtag agaaactgaa ttttgagaat accttcttc gcttaaagtt aaataccttg 300
 aataagaagc ttgtagaat agaatcgcat gtgagcaatg atttgtaaac tgcaattgaa 360
 ataagcagtc tttctgagtt ccaccaaggt tcttttctcc tgtcagctac caagaacaa 420
 aggaacagta agcagtgcaa gcctgcgcat cttccatatg caagagttct gttaacttca 480
 gaaaatgatg atgatgatgg tgctgatgat aaatggcaga caaagtgtaa caacagaact 540

atatcaaaga cctcacctga tagtacctct tcagtatcaa gacaaccttc atccttacat 600
cagtgcatt tgaaagcatt cctcctaaa gaagataatc agaagacatg tgggtcaggt 660
catttagaac atacttcaag tgttgatata cttcctaag agagccactc agatcaaagt 720
cctaagagtt ctctgagtga gatgaaaact gctccatctc ccagcctcag aagggaaaaa 780
ttatcacatg gtaatgtgac tatgaggaag aagtgtgtgt cttcaactcc agacattctg 840
tatgtgacag atttagatca ccaaccaact tcaagtccag gatcaaattg gaataatgag 900
atacatggtc atactaatga aaccagcaat aacacgcaa gaaatgccga gtgttttctt 960
gacttacctt ctgagtcttc cagtgagcct gacgcaaagc gcatggagct agtgcagaag 1020
aacaccgata gctttcactt ccagaaaact gtatatgatg ccgctgatat ggagttaact 1080
gctactgaca taggcaagat tgtagcagtt tcaaaaagca agaaaaatca aaataagaaa 1140
aaggcagact gtagaaagga gactttcaga aaagtgaag gtgcaagctc tgataaaaag 1200
agagaaagct caaagagaga atgtaaagat gggtcagaag taggtgctga ggaagaggct 1260
gatgcagcca gagcagaaag aggcgctggt gtcctggatg gcagagggga ttcagaagag 1320
ccaaactgca tttccagtac tgagcagcca tctcaggtaa acacgcaaaa gaaaagaacc 1380
ctccagaaca gctcagatca ggagaacatt caaaatacga agaggaggca aacatatacg 1440
acagatgagc aagaggaaac aaaccctttc tccagacatt cagtcaaatt tcttcaagat 1500
ggtaaatttg atctgtgtca gaaaacccta catcataatt taagtaagcc ttctcgacag 1560
acatttgtga ttcgtaagtc agaaaaagat aacttatttc caaatcaaga agataaagac 1620
accatttctg aaaacctaga agttacaaat gaatttcata tagatgatct ttccatcgaa 1680
gctaataaaa atgtatgtga ccatgagact cagacaatgt tggacttgaa aaagtctgtc 1740
agtgtcaac aaaatcaaac aaaaataaat aagactaagc agaaaataaa tcgaaggaca 1800
aaaataattt ctgtcatgag ccaagtatat gaggacaatg ataaagatat tcacgtccta 1860
gaaaaagaca actttccctt tcatacccaa gcaaataaag aaaccaccag tggaaaccta 1920
gaaagttcaa aagaatttga atcacctctt cttttcacia gagacaacgg aagcttacgt 1980
gactgtaaga ccagaatgt tctggatctg cacaagcaaa ttcctgatct ataccctgat 2040

cggaatgagt cccagattag caaaatccct aggcaaaaag taaatcgcaa gacagaagta 2100
atttctggag tgaaatgttt tagtaatgac caagggtgtc attgctcaga aaaggataag 2160
tctttgttac tacaaaagga taaagacttc ccaggaactt taaaagactt aagtgagttt 2220
gatacgctg ctttttgtaa caaagatagt gcaaagtcgt gtgattataa gtctgaaatg 2280
ctcttggggt tgaaaaaaca tgacccta atgcaacctg cttgtcaaga tgattcaaaa 2340
gcaggtaaga aacttagaca aaaggtaaat cgaaaaacag aaataatttc taaaatcacc 2400
caaatacatg aaaatgatag aggaagtaca catgactcat taaataagaa gctctgtcag 2460
aaggttaata tatcaaaaat catttctcaa atgaaccaa tatatgagac tattaatgaa 2520
gatggaaatg gctttaaaag ctctatcaaa gattgcgaag atattaaaag ttgtgacttt 2580
ggggaaatca acagtaataa aaaggaaaat tatgatccaa ttcaagatcc ttgcacactg 2640
gttaaaaaaa caaagagaaa gggatcatgt aaagcaggga gcagtttggc aggagctaag 2700
aacagggtgt gtttgcagtt aacagactct tcccaggtag agtctgtccc cttagactct 2760
ggcttaagac accatccaaa cgaagcagat tctggctcctg gagagcagac taacctgcca 2820
aagatgcaga acaaagcgc tgggaggtca ctgggagatg ctttctctgt gagtctggga 2880
aaagaaggaa gccgcccagc caaagcagtt agtaaaatga cacccaaatc aaagaagaga 2940
aagctccctc tcggttgttc tcctgaaacc cacgggacgg tggagataac acccaacact 3000
gacctcgcta aggctgttga ctcccaacag actgagaagg agaactattt ggagaaggag 3060
aaaattgcca agaggaagcc agatttttgt acaaaggtgt tgaaaccttt atctgagaca 3120
tgttcatcta acataaagaa ttcttccttg gacagtatgt gtaagagttc gctacctttg 3180
agtatttctt ctagaaaaac cctgatgctg gaagaaagtt cttccctgga gagtacatgc 3240
atctttcaag taggtgatgc cgctcatgag aagataacga caggcacacg taatccccac 3300
cacaggacac agaagtcgac accgggtagc agaacgtccc tggctttggg ggataccagt 3360
tctgtttcag ataccaaccc tgctaacccc gagaatgagt cagaagggca gtcttcacac 3420
ccaatgagaa ggaaaagaca gtgcgtccct ctcaacctga cagagccaag ccttagaagc 3480
aagatgagga gataa 3495

<210> 16
 <211> 1164
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 16

Met Glu Tyr Pro Gly Ile Lys Val Asp Thr Val Thr Ser Gly Ile Gln
 1 5 10 15

Arg Arg Val Lys Gly Arg Ile Ala Lys Thr Asn Leu Asn Val Ser Leu
 20 25 30

Ala Ser Lys Ile Lys Ala Lys Ile Leu Asn Asn Ser Ser Ile Phe Lys
 35 40 45

Ile Ser Leu Lys His Asn Asn Arg Ala Leu Ala Arg Ala Leu Ser Lys
 50 55 60

Glu Lys Glu Asn Ser Arg Arg Ile Thr Thr Glu Lys Met Gln Leu Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Val Glu Lys Leu Asn Phe Glu Asn Thr Phe Leu Arg Leu Lys
 85 90 95

Leu Asn Thr Leu Asn Lys Lys Leu Val Glu Ile Glu Ser His Val Ser
 100 105 110

Asn Asp Leu Leu Thr Ala Ile Glu Ile Ser Ser Leu Ser Glu Phe His
 115 120 125

Gln Gly Ser Phe Leu Leu Ser Ala Thr Lys Lys Gln Arg Asn Ser Lys
 130 135 140

Gln Cys Lys Pro Ala His Leu Pro Tyr Ala Arg Val Leu Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Glu Asn Asp Asp Asp Asp Gly Ala Asp Asp Lys Trp Gln Thr Lys Cys
 165 170 175

Asn Asn Arg Thr Ile Ser Lys Thr Ser Pro Asp Ser Thr Ser Ser Val
180 185 190

Ser Arg Gln Pro Ser Ser Leu His Gln Cys Asn Leu Lys Ala Phe Pro
195 200 205

Pro Lys Glu Asp Asn Gln Lys Thr Cys Gly Ser Gly His Leu Glu His
210 215 220

Thr Ser Ser Val Asp Ile Leu Pro Asn Glu Ser His Ser Asp Gln Ser
225 230 235 240

Pro Lys Ser Ser Leu Ser Glu Met Lys Thr Ala Pro Ser Pro Ser Leu
245 250 255

Arg Arg Glu Lys Leu Ser His Gly Asn Val Thr Met Arg Lys Lys Cys
260 265 270

Val Ser Ser Thr Pro Asp Ile Leu Tyr Val Thr Asp Leu Asp His Gln
275 280 285

Pro Thr Ser Ser Pro Gly Ser Asn Trp Asn Asn Glu Ile His Gly His
290 295 300

Thr Asn Glu Thr Ser Asn Asn Thr Gln Arg Asn Ala Glu Cys Phe Leu
305 310 315 320

Asp Leu Pro Ser Glu Ser Ser Ser Glu Pro Asp Ala Lys Arg Met Glu
325 330 335

Leu Val Gln Lys Asn Thr Asp Ser Phe His Phe Gln Lys Thr Val Tyr
340 345 350

Asp Ala Ala Asp Met Glu Leu Thr Ala Thr Asp Ile Gly Lys Ile Val
355 360 365

Ala Val Ser Lys Ser Lys Lys Asn Gln Asn Lys Lys Lys Ala Asp Cys
370 375 380

Arg Lys Glu Thr Phe Arg Lys Val Lys Gly Ala Ser Ser Asp Lys Lys
385 390 395 400

Arg Glu Ser Ser Lys Arg Glu Cys Lys Asp Gly Ser Glu Val Gly Ala
405 410 415

Glu Glu Glu Ala Asp Ala Ala Arg Ala Glu Arg Gly Ala Gly Val Leu
420 425 430

Asp Gly Arg Gly Asp Ser Glu Glu Pro Asn Cys Ile Ser Ser Thr Glu
435 440 445

Gln Pro Ser Gln Val Asn Thr Gln Lys Lys Arg Thr Leu Gln Asn Ser
450 455 460

Ser Asp Gln Glu Asn Ile Gln Asn Thr Lys Arg Arg Gln Thr Tyr Thr
465 470 475 480

Thr Asp Glu Gln Glu Glu Thr Asn Pro Phe Ser Arg His Ser Val Lys
485 490 495

Phe Leu Gln Asp Gly Lys Phe Asp Leu Cys Gln Lys Thr Leu His His
500 505 510

Asn Leu Ser Lys Pro Ser Arg Gln Thr Phe Val Ile Arg Lys Ser Glu
515 520 525

Lys Asp Asn Leu Phe Pro Asn Gln Glu Asp Lys Asp Thr Ile Ser Glu
530 535 540

Asn Leu Glu Val Thr Asn Glu Phe His Ile Asp Asp Leu Ser Ile Glu
545 550 555 560

Ala Asn Glu Asn Val Cys Asp His Glu Thr Gln Thr Met Leu Asp Leu
565 570 575

Lys Lys Ser Val Ser Ala Gln Gln Asn Gln Thr Lys Ile Asn Lys Thr
580 585 590

Lys Gln Lys Ile Asn Arg Arg Thr Lys Ile Ile Ser Val Met Ser Gln
595 600 605

Val Tyr Glu Asp Asn Asp Lys Asp Ile His Val Leu Glu Lys Asp Asn
610 615 620

Phe Pro Phe His Thr Gln Ala Asn Lys Glu Thr Thr Ser Gly Asn Leu
625 630 635 640

Glu Ser Ser Lys Glu Phe Glu Ser Pro Leu Leu Phe Thr Arg Asp Asn
645 650 655

Gly Ser Leu Arg Asp Cys Lys Thr Gln Asn Val Leu Asp Leu His Lys
660 665 670

Gln Ile Pro Asp Leu Tyr Pro Asp Arg Asn Glu Ser Gln Ile Ser Lys
675 680 685

Ile Pro Arg Gln Lys Val Asn Arg Lys Thr Glu Val Ile Ser Gly Val
690 695 700

Lys Cys Phe Ser Asn Asp Gln Gly Val His Cys Ser Glu Lys Asp Lys
705 710 715 720

Ser Leu Leu Leu Gln Lys Asp Lys Asp Phe Pro Gly Thr Leu Lys Asp
725 730 735

Leu Ser Glu Phe Asp Thr Pro Ala Phe Cys Asn Lys Asp Ser Ala Lys
740 745 750

Ser Cys Asp Tyr Lys Ser Glu Met Leu Leu Gly Leu Lys Lys His Asp
755 760 765

Pro Asn Met Gln Pro Ala Cys Gln Asp Asp Ser Lys Ala Gly Lys Lys
770 775 780

Leu Arg Gln Lys Val Asn Arg Lys Thr Glu Ile Ile Ser Lys Ile Thr
785 790 795 800

Gln Ile His Glu Asn Asp Arg Gly Ser Thr His Asp Ser Leu Asn Lys
805 810 815

Lys Leu Cys Gln Lys Val Asn Ile Ser Lys Ile Ile Ser Gln Met Asn
820 825 830

Gln Ile Tyr Glu Thr Ile Asn Glu Asp Gly Asn Gly Phe Lys Ser Ser
835 840 845

Ile Lys Asp Cys Glu Asp Ile Lys Ser Cys Asp Phe Gly Glu Ile Asn
850 855 860

Ser Asn Lys Lys Glu Asn Tyr Asp Pro Ile Gln Asp Pro Cys Thr Leu
865 870 875 880

Val Lys Lys Thr Lys Arg Lys Gly Ser Cys Lys Ala Gly Ser Ser Leu
885 890 895

Ala Gly Ala Lys Asn Arg Cys Gly Leu Gln Leu Thr Asp Ser Ser Gln
900 905 910

Val Gln Ser Val Pro Leu Asp Ser Gly Leu Arg His His Pro Asn Glu
915 920 925

Ala Asp Ser Gly Pro Gly Glu Gln Thr Asn Leu Pro Lys Met Gln Lys
930 935 940

Gln Ser Ala Gly Arg Ser Leu Gly Asp Ala Phe Ser Val Ser Leu Gly
945 950 955 960

Lys Glu Gly Ser Arg Pro Ala Lys Ala Val Ser Lys Met Thr Pro Lys
965 970 975

Ser Lys Lys Arg Lys Leu Pro Leu Gly Cys Ser Pro Glu Thr His Gly
 980 985 990

Thr Val Glu Ile Thr Pro Asn Thr Asp Leu Ala Lys Ala Val Asp Ser
 995 1000 1005

Gln Gln Thr Glu Lys Glu Asn Tyr Leu Glu Lys Glu Lys Ile Ala
 1010 1015 1020

Lys Arg Lys Pro Asp Phe Cys Thr Lys Val Leu Lys Pro Leu Ser
 1025 1030 1035

Glu Thr Cys Ser Ser Asn Ile Lys Asn Ser Ser Leu Asp Ser Met
 1040 1045 1050

Cys Lys Ser Ser Leu Pro Leu Ser Ile Ser Ser Arg Lys Thr Leu
 1055 1060 1065

Met Leu Glu Glu Ser Ser Ser Leu Glu Ser Thr Cys Ile Phe Gln
 1070 1075 1080

Val Gly Asp Ala Ala His Glu Lys Ile Thr Thr Gly Thr Arg Asn
 1085 1090 1095

Pro His His Arg Thr Gln Lys Ser Thr Pro Gly Ser Arg Thr Ser
 1100 1105 1110

Leu Val Leu Val Asp Thr Ser Ser Val Ser Asp Thr Asn Pro Ala
 1115 1120 1125

Asn Pro Glu Asn Glu Ser Glu Gly Gln Ser Ser His Pro Met Arg
 1130 1135 1140

Arg Lys Arg Gln Cys Val Pro Leu Asn Leu Thr Glu Pro Ser Leu
 1145 1150 1155

Arg Ser Lys Met Arg Arg
1160

<210> 17

<211> 1525

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

```

tcgcccacgc gtccgaagga ataaaaactt ggcagagatt ggcaaacgca ggtcttttat      60
agctgcacca tgccaaataa tcaccaacac ttctacactg ctgaaaaatt accaagacaa      120
caacaaaatg ttagtttttag ctttggaaaa tgaaaaatcc aaagtgaaag aagcccaaga      180
tatcatccta cagctgagaa aagaatgtta ctatctcaca tgtcagctat atgcattgaa      240
aggaaaactt acatcacaac aaacagtaga acctgctcag aaccaggaaa tatgttcctc      300
tggaatggac cccaatagtg atgacagctc cagaaattta tttgtgaagg atttaccgca      360
aattcctctt gaagaaactg aacttccagg acaaggagaa tcatttcaaa tagaagatca      420
gatacctact attcctcaag acacactggg agttgatttt gattcaggtg aagctaagtc      480
tactgataat gtcttaccta gaactgtatc tgttcgtagc agtttaaaga aacattgtaa      540
cagtatatgt cagtttgata gcttggatga ttttgaaacc agtcatttgg caggggaagtc      600
ttttgaattc gaaagagttg gatttttaga cccactagta aacatgcaca tacctgaaaa      660
tgtacaacac aatgcttgtc aatggagcaa ggaccaagtt aacttatcac caaagctgat      720
tcagccagga acgtttacta aaacaaaaga agacatttta gaatctaaat ctgaacaaac      780
taaaagtaag caaagagata cacaagaaag aaaaagagaa gagaaaagaa aagctaacag      840
gagaaaatca aaacgtatgt caaatataa agagaataaa agcgaaaata aaaaaactgt      900
tccccaaaaa aaaatgcaca aatctgtcag ttccaatgat gcttacaatt ttaatttgga      960
agagggtggt catcttactc ctttccgaca aaaagtgagc aatgactcta atagagaaga     1020
aaacaacgag tctgaagtga gcctctgtga atcaagtggg tcaggagatg attccgatga     1080
cctctatttg cccacttgca agtacattca gaatcccacg agcaattcag atagaccagt     1140
caccaggcct ctagctaaaa gagcactgaa atacacagat gaaaaagaga cggagggttc     1200

```

taagccaaca aaaactccta ccactacacc acctgaaact cagcagtcac ctcactcttag 1260
 cctgaaggat atcaccaatg tctccttgta tcctgtttgtg aaaatcagaa gacttttctt 1320
 ttctccaaaa aagaataaag caagcccagc agtggctctg cctaaacgta ggtgcacagc 1380
 cagcgtgaac tataaggagc ccaccctcgc ttcgaaactg agaagagggg acccttttac 1440
 agatttgtgt tttttgaatt ctcctatitt caagcagaaa aaggatttga gacgttctaa 1500
 aaaaagtatg aaacaaatac aatga 1525

<210> 18
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Arg Val Gly Arg Pro Arg Val Arg Arg Asn Lys Asn Leu Ala Glu
 1 5 10 15

Ile Gly Lys Arg Arg Ser Phe Ile Ala Ala Pro Cys Gln Ile Ile Thr
 20 25 30

Asn Thr Ser Thr Leu Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Asn Asn Lys Met Leu
 35 40 45

Val Leu Ala Leu Glu Asn Glu Lys Ser Lys Val Lys Glu Ala Gln Asp
 50 55 60

Ile Ile Leu Gln Leu Arg Lys Glu Cys Tyr Tyr Leu Thr Cys Gln Leu
 65 70 75 80

Tyr Ala Leu Lys Gly Lys Leu Thr Ser Gln Gln Thr Val Glu Pro Ala
 85 90 95

Gln Asn Gln Glu Ile Cys Ser Ser Gly Met Asp Pro Asn Ser Asp Asp
 100 105 110

Ser Ser Arg Asn Leu Phe Val Lys Asp Leu Pro Gln Ile Pro Leu Glu
 115 120 125

Glu Thr Glu Leu Pro Gly Gln Gly Glu Ser Phe Gln Ile Glu Asp Gln
130 135 140

Ile Pro Thr Ile Pro Gln Asp Thr Leu Gly Val Asp Phe Asp Ser Gly
145 150 155 160

Glu Ala Lys Ser Thr Asp Asn Val Leu Pro Arg Thr Val Ser Val Arg
165 170 175

Ser Ser Leu Lys Lys His Cys Asn Ser Ile Cys Gln Phe Asp Ser Leu
180 185 190

Asp Asp Phe Glu Thr Ser His Leu Ala Gly Lys Ser Phe Glu Phe Glu
195 200 205

Arg Val Gly Phe Leu Asp Pro Leu Val Asn Met His Ile Pro Glu Asn
210 215 220

Val Gln His Asn Ala Cys Gln Trp Ser Lys Asp Gln Val Asn Leu Ser
225 230 235 240

Pro Lys Leu Ile Gln Pro Gly Thr Phe Thr Lys Thr Lys Glu Asp Ile
245 250 255

Leu Glu Ser Lys Ser Glu Gln Thr Lys Ser Lys Gln Arg Asp Thr Gln
260 265 270

Glu Arg Lys Arg Glu Glu Lys Arg Lys Ala Asn Arg Arg Lys Ser Lys
275 280 285

Arg Met Ser Lys Tyr Lys Glu Asn Lys Ser Glu Asn Lys Lys Thr Val
290 295 300

Pro Gln Lys Lys Met His Lys Ser Val Ser Ser Asn Asp Ala Tyr Asn
305 310 315 320

Phe Asn Leu Glu Glu Gly Val His Leu Thr Pro Phe Arg Gln Lys Val
325 330 335

Ser Asn Asp Ser Asn Arg Glu Glu Asn Asn Glu Ser Glu Val Ser Leu
340 345 350

Cys Glu Ser Ser Gly Ser Gly Asp Asp Ser Asp Asp Leu Tyr Leu Pro
355 360 365

Thr Cys Lys Tyr Ile Gln Asn Pro Thr Ser Asn Ser Asp Arg Pro Val
370 375 380

Thr Arg Pro Leu Ala Lys Arg Ala Leu Lys Tyr Thr Asp Glu Lys Glu
385 390 395 400

Thr Glu Gly Ser Lys Pro Thr Lys Thr Pro Thr Thr Thr Pro Pro Glu
405 410 415

Thr Gln Gln Ser Pro His Leu Ser Leu Lys Asp Ile Thr Asn Val Ser
420 425 430

Leu Tyr Pro Val Val Lys Ile Arg Arg Leu Ser Leu Ser Pro Lys Lys
435 440 445

Asn Lys Ala Ser Pro Ala Val Ala Leu Pro Lys Arg Arg Cys Thr Ala
450 455 460

Ser Val Asn Tyr Lys Glu Pro Thr Leu Ala Ser Lys Leu Arg Arg Gly
465 470 475 480

Asp Pro Phe Thr Asp Leu Cys Phe Leu Asn Ser Pro Ile Phe Lys Gln
485 490 495

Lys Lys Asp Leu Arg Arg Ser Lys Lys Ser Met Lys Gln Ile Gln
500 505 510

<210> 19

<211> 3798

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

atggagtgcc cagtgatgga aactggctca ctttttacct caggaattaa gagacatttg 60
aaagacaaaa gaatttcaaa gactactaag ttgaatgttt ctcttgcttc aaaaataaaa 120
acaaaaatac taaataattc ttctattttc aaaatatctt taaagcacao caacagggca 180
ttagctcagg ctcttagtag agaaaaagag aattctcgaa gaattacaac tgaaaagatg 240
ctattgcaaa aagaagtaga gaaactgaat ttgagaaca ctttcttcg cctaaagcta 300
aataacttga ataagaagct tatagacata gaagctctca tgaacaataa cttgataact 360
gcaactgaaa tgagcagtct ttctgagttc catcagagtt ctttctact gtcagctagc 420
aagaagaaac gagttagtaa acagtgcaag ttgatgcgtc ttccatttgc aagggttcca 480
ttaacttcaa atgatgatga agatgaagat aaagagaaaa tgcagtgtga caacaatatt 540
aatcaaaga cattacctga tattccctct tcaggatcaa caacacaacc tttatcaact 600
caggataatt cggaagtgtt atttcttaaa gaaaataatc aaaatgtata tggtttagat 660
gattcagaac atatttcttc tatagttgat gtacctcca gagaaagcca ttcccactca 720
gaccaaagtt ctaagacttc tctaagtgtg gagatgagaa acgcccagtc tattggccgc 780
agatgggaga aaccatctcc tagtaatgtg actgaaagga agaagcgtgg gtcactttgg 840
gaatcaaata atctttctgc agacactccc tgtgcaacag ttttagataa acaacacatt 900
tcaagtccag aattaaattg caataatgag ataaatggtc atactaatga aacaaatact 960
gaaatgcaaa gaaataaaca ggatcttcct ggcttatctt ctgagtctgc cagagaacct 1020
aatgcagagt gcatgaatca aattgaggat aatgatgact ttcaattgca gaaaactgtg 1080
tatgatgctg acatggattt aactgctagt gaagtcagca aaattgtcac agtctcaaca 1140
ggcattaaaa agaaaagtaa taaaaaaca aatgaacatg gaatgaaaac tttcagaaaa 1200
gtgaaagatt ccagctctga aaaaaagaga gaaagatcaa agagacagtt taaaaatagt 1260
tcagatgtcg atattgggga aaagattgaa aacaggacag aaagatctga tgtcctggat 1320
ggcaaaaggg gtgcagaaga tcccggtttt attttcaata atgaacagct ggctcagatg 1380

aatgaacagc tggctcaggt gaatgaacta aagaaaatga cccttcaaac tggctttgaa 1440
caaggtgaca gagaaaatgt actgtgtaat aaaaaggaga aaagaataac aaatgagcaa 1500
gaggaaacat actctttatc ccaaagttca ggtaaatttc accaggagag taaatttgat 1560
aagggtcaga attccctaac ttgtaataaa agtaaagcct ctagacagac atttgtgatt 1620
caciaattag aaaaagataa cttactccca aaccaaagg ataaagtaac catttatgaa 1680
aacctagacg tcacaaatga atttcacaca gccaatcttt ccaccaaaga taatggaaat 1740
ttatgtgatt atgggacca caatatattg gatttgaaaa agtatgtcac tgatattcaa 1800
ccctcagagc aaaatgaatc aaacattaat aagcttagaa agaaagtaaa ccggaagaca 1860
gaaataattt ctggaatgaa ccacatgtat gaagataatg ataaagatgt ggtgcatggc 1920
ctaaaaaag gtaatttttt tttcaaaacc caagaggata aagaacctat ctctgaaaac 1980
atagaagttt ccaaagagct tcaaattcca gctctttcta ctagagataa tgaaaatcaa 2040
tgtgactata ggaccagaa tgtgttgggt ttgcaaaagc agatcaccaa tatgtacccc 2100
gttcagcaaa atgaatcaaa agttaataag aagcttaggc agaaagtaaa tcggaagaca 2160
gaaataattt ctgaagtga tcathtagat aatgacaaaa gtatagaata cacagttaaa 2220
agtcactcac tctttttaac gcaaaaagat aaggaaataa tccccgaaa cctagaagac 2280
ccaagtgagt ttgaaacacc tgctctttct accaaagata gtggaaacct gtatgattct 2340
gagattcaaa atgttttggg ggtgaaacat ggccatgata tgcaacctgc ttgtcaaaat 2400
gattcaaaaa taggtaagaa gcctagacta aatgtatgtc aaaagtcaga aataattcct 2460
gaaaccaacc aaatatatga gaatgataac aaaggtgtac atgacctaga aaaagataac 2520
ttcttctctc taaccccaaa ggataaagaa acaatttctg aaaatctaca agtcacaaat 2580
gaatttcaaa cagttgatct tctcatcaaa gataatggaa atttatgtga ttatgacacc 2640
cagaatatat tggagttgaa aaagtatgtt actgatagga aatctgctga gcaaaatgaa 2700
tcaaaaataa ataagctcag gaataaagtg aattggaaga cagaaataat ttctgaaatg 2760
aaccagatat atgaggataa tgataaagat gcacatgtcc aagaaagcta taaaaagat 2820
cttgatttta aagtaaataa atctaataaa aaacttgaat gccaagacat tatcaataaa 2880

cactatatgg aagtcaacag taatgaaaag gaaagttgtg atcaaatttt agattcctac 2940
 aaagtagtta aaaaacgtaa gaaagaatca tcatgcaagg caaagaacat tttgacaaaa 3000
 gctaagaaca aacttgcttc acagttaaca gaatcttcac agacatctat ctcccttagaa 3060
 tctgatttta aacatattac tagtgaagca gattctgac caggaaaccc agttgaacta 3120
 tgtaagactc agaagcaaag cactaccact ttgaataaaa aagatctccc ttttgtggaa 3180
 gaaataaaag aaggagagtg tcagggtaaa aaggtaaata aaatgacatc taagtcaaag 3240
 aaaaggaaga cctccataga tccttctcca gagagccatg aagtaatgga aagaatacitt 3300
 gacagcggtc agggaaagtc tactgtatct gaacaagctg ataaggaaaa caatttggag 3360
 aatgagaaaa tgggtcaaaaa taagccagac ttttacacaa aggcatttag atctttgtct 3420
 gagatacatt cacctaacat acaagattct tcctttgaca gtgttcgtga aggttttagta 3480
 cctttgagcg tttcttctgg taaaaatgtg ataataaaag aaaattttgc ctltggagtgc 3540
 tccccagcct ttcaagtaag tgatgatgag catgagaaga tgaacaagat gaaattttaa 3600
 gtcaaccgga gaacccaaaa atcaggaata ggtgatagac cattacagga cttgtcaaat 3660
 accagttttg tttcaaataa cactgctgaa tctgaaaata agtcagaaga tctatcttca 3720
 gaacggacaa gcagaagaag aaggtgtact cctttctatt ttaaagagcc aagcctcaga 3780
 gacaagatga gaagatga 3798

<210> 20
 <211> 1265
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Cys Pro Val Met Glu Thr Gly Ser Leu Phe Thr Ser Gly Ile
 1 5 10 15

Lys Arg His Leu Lys Asp Lys Arg Ile Ser Lys Thr Thr Lys Leu Asn
 20 25 30

Val Ser Leu Ala Ser Lys Ile Lys Thr Lys Ile Leu Asn Asn Ser Ser
 35 40 45

Ile Phe Lys Ile Ser Leu Lys His Asn Asn Arg Ala Leu Ala Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Arg Glu Lys Glu Asn Ser Arg Arg Ile Thr Thr Glu Lys Met
65 70 75 80

Leu Leu Gln Lys Glu Val Glu Lys Leu Asn Phe Glu Asn Thr Phe Leu
85 90 95

Arg Leu Lys Leu Asn Asn Leu Asn Lys Lys Leu Ile Asp Ile Glu Ala
100 105 110

Leu Met Asn Asn Asn Leu Ile Thr Ala Ile Glu Met Ser Ser Leu Ser
115 120 125

Glu Phe His Gln Ser Ser Phe Leu Leu Ser Ala Ser Lys Lys Lys Arg
130 135 140

Ile Ser Lys Gln Cys Lys Leu Met Arg Leu Pro Phe Ala Arg Val Pro
145 150 155 160

Leu Thr Ser Asn Asp Asp Glu Asp Glu Asp Lys Glu Lys Met Gln Cys
165 170 175

Asp Asn Asn Ile Lys Ser Lys Thr Leu Pro Asp Ile Pro Ser Ser Gly
180 185 190

Arg Thr Thr Gln Pro Leu Ser Thr Gin Asp Asn Ser Gly Val Leu Phe
195 200 205

Leu Lys Glu Asn Asn Gln His Val Tyr Gly Leu Asp Asp Ser Glu His
210 215 220

Ile Ser Ser Ile Val Asp Val Pro Pro Arg Glu Ser His Ser His Ser
225 230 235 240

Asp Gln Ser Ser Lys Thr Ser Leu Met Ser Glu Met Arg Asn Ala Gln
 245 250 255

Ser Ile Gly Arg Arg Trp Glu Lys Pro Ser Pro Ser Asn Val Thr Glu
 260 265 270

Arg Lys Lys Arg Gly Ser Ser Trp Glu Ser Asn Asn Leu Ser Ala Asp
 275 280 285

Thr Pro Cys Ala Thr Val Leu Asp Lys Gln His Ile Ser Ser Pro Glu
 290 295 300

Leu Asn Cys Asn Asn Glu Ile Asn Gly His Thr Asn Glu Thr Asn Thr
 305 310 315 320

Glu Met Gln Arg Asn Lys Gln Asp Leu Pro Gly Leu Ser Ser Glu Ser
 325 330 335

Ala Arg Glu Pro Asn Ala Glu Cys Met Asn Gln Ile Glu Asp Asn Asp
 340 345 350

Asp Phe Gln Leu Gln Lys Thr Val Tyr Asp Ala Asp Met Asp Leu Thr
 355 360 365

Ala Ser Glu Val Ser Lys Ile Val Thr Val Ser Thr Gly Ile Lys Lys
 370 375 380

Lys Ser Asn Lys Lys Thr Asn Glu His Gly Met Lys Thr Phe Arg Lys
 385 390 395 400

Val Lys Asp Ser Ser Ser Glu Lys Lys Arg Glu Arg Ser Lys Arg Gln
 405 410 415

Phe Lys Asn Ser Ser Asp Val Asp Ile Gly Glu Lys Ile Glu Asn Arg
 420 425 430

Thr Glu Arg Ser Asp Val Leu Asp Gly Lys Arg Gly Ala Glu Asp Pro
 435 440 445

Gly Leu Phe Phe Asn Asn Glu Gln Leu Ala Gln Met Asn Glu Gln Leu
450 455 460

Ala Gln Val Asn Glu Leu Lys Lys Met Thr Leu Gln Thr Gly Phe Glu
465 470 475 480

Gln Gly Asp Arg Glu Asn Val Leu Cys Asn Lys Lys Glu Lys Arg Val
485 490 495

Thr Asn Glu Gln Glu Glu Thr Tyr Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gly Lys
500 505 510

Phe His Gln Glu Ser Lys Phe Asp Lys Gly Gln Asn Ser Leu Thr Cys
515 520 525

Asn Lys Ser Lys Ala Ser Arg Gln Thr Phe Val Ile His Lys Leu Glu
530 535 540

Lys Asp Asn Leu Leu Pro Asn Gln Lys Asp Lys Val Thr Ile Tyr Glu
545 550 555 560

Asn Leu Asp Val Thr Asn Glu Phe His Thr Ala Asn Leu Ser Thr Lys
565 570 575

Asp Asn Gly Asn Leu Cys Asp Tyr Gly Thr His Asn Ile Leu Asp Leu
580 585 590

Lys Lys Tyr Val Thr Asp Ile Gln Pro Ser Glu Gln Asn Glu Ser Asn
595 600 605

Ile Asn Lys Leu Arg Lys Lys Val Asn Arg Lys Thr Glu Ile Ile Ser
610 615 620

Gly Met Asn His Met Tyr Glu Asp Asn Asp Lys Asp Val Val His Gly
625 630 635 640

Leu Lys Lys Gly Asn Phe Phe Phe Lys Thr Gln Glu Asp Lys Glu Pro
645 650 655

Ile Ser Glu Ser Ile Glu Val Ser Lys Glu Leu Gln Ile Pro Ala Leu
660 665 670

Ser Thr Arg Asp Asn Glu Asn Gln Cys Asp Tyr Arg Thr Gln Asn Val
675 680 685

Leu Gly Leu Gln Lys Gln Ile Thr Asn Met Tyr Pro Val Gln Gln Asn
690 695 700

Glu Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Arg Gln Lys Val Asn Arg Lys Thr
705 710 715 720

Glu Ile Ile Ser Glu Val Asn His Leu Asp Asn Asp Lys Ser Ile Glu
725 730 735

Tyr Thr Val Lys Ser His Ser Leu Phe Leu Thr Gln Lys Asp Lys Glu
740 745 750

Ile Ile Pro Gly Asn Leu Glu Asp Pro Ser Glu Phe Glu Thr Pro Ala
755 760 765

Leu Ser Thr Lys Asp Ser Gly Asn Leu Tyr Asp Ser Glu Ile Gln Asn
770 775 780

Val Leu Gly Val Lys His Gly His Asp Met Gln Pro Ala Cys Gln Asn
785 790 795 800

Asp Ser Lys Ile Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asn Val Cys Gln Lys Ser
805 810 815

Glu Ile Ile Pro Glu Thr Asn Gln Ile Tyr Glu Asn Asp Asn Lys Gly
820 825 830

Val His Asp Leu Glu Lys Asp Asn Phe Phe Ser Leu Thr Pro Lys Asp
835 840 845

Lys Glu Thr Ile Ser Glu Asn Leu Gln Val Thr Asn Glu Phe Gln Thr
850 855 860

Val Asp Leu Leu Ile Lys Asp Asn Gly Asn Leu Cys Asp Tyr Asp Thr
865 870 875 880

Gln Asn Ile Leu Glu Leu Lys Lys Tyr Val Thr Asp Arg Lys Ser Ala
885 890 895

Glu Gln Asn Glu Ser Lys Ile Asn Lys Leu Arg Asn Lys Val Asn Trp
900 905 910

Lys Thr Glu Ile Ile Ser Glu Met Asn Gln Ile Tyr Glu Asp Asn Asp
915 920 925

Lys Asp Ala His Val Gln Glu Ser Tyr Thr Lys Asp Leu Asp Phe Lys
930 935 940

Val Asn Lys Ser Lys Gln Lys Leu Glu Cys Gln Asp Ile Ile Asn Lys
945 950 955 960

His Tyr Met Glu Val Asn Ser Asn Glu Lys Glu Ser Cys Asp Gln Ile
965 970 975

Leu Asp Ser Tyr Lys Val Val Lys Lys Arg Lys Lys Glu Ser Ser Cys
980 985 990

Lys Ala Lys Asn Ile Leu Thr Lys Ala Lys Asn Lys Leu Ala Ser Gln
995 1000 1005

Leu Thr Glu Ser Ser Gln Thr Ser Ile Ser Leu Glu Ser Asp Leu
1010 1015 1020

Lys His Ile Thr Ser Glu Ala Asp Ser Asp Pro Gly Asn Pro Val
1025 1030 1035

Glu Leu Cys Lys Thr Gln Lys Gln Ser Thr Thr Thr Leu Asn Lys
1040 1045 1050

Lys Asp Leu Pro Phe Val Glu Glu Ile Lys Glu Gly Glu Cys Gln
1055 1060 1065

Val Lys Lys Val Asn Lys Met Thr Ser Lys Ser Lys Lys Arg Lys
1070 1075 1080

Thr Ser Ile Asp Pro Ser Pro Glu Ser His Glu Val Met Glu Arg
1085 1090 1095

Ile Leu Asp Ser Val Gln Gly Lys Ser Thr Val Ser Glu Gln Ala
1100 1105 1110

Asp Lys Glu Asn Asn Leu Glu Asn Glu Lys Met Val Lys Asn Lys
1115 1120 1125

Pro Asp Phe Tyr Thr Lys Ala Phe Arg Ser Leu Ser Glu Ile His
1130 1135 1140

Ser Pro Asn Ile Gln Asp Ser Ser Phe Asp Ser Val Arg Glu Gly
1145 1150 1155

Leu Val Pro Leu Ser Val Ser Ser Gly Lys Asn Val Ile Ile Lys
1160 1165 1170

Glu Asn Phe Ala Leu Glu Cys Ser Pro Ala Phe Gln Val Ser Asp
1175 1180 1185

Asp Glu His Glu Lys Met Asn Lys Met Lys Phe Lys Val Asn Arg
1190 1195 1200

Arg Thr Gln Lys Ser Gly Ile Gly Asp Arg Pro Leu Gln Asp Leu
1205 1210 1215

Ser Asn Thr Ser Phe Val Ser Asn Asn Thr Ala Glu Ser Glu Asn
1220 1225 1230

Lys Ser Glu Asp Leu Ser Ser Glu Arg Thr Ser Arg Arg Arg
1235 1240 1245

Cys Thr Pro Phe Tyr Phe Lys Glu Pro Ser Leu Arg Asp Lys Met
1250 1255 1260

Arg Arg
1265

<210> 21
<211> 45
<212> PRT
<213> yeast

<400> 21

Met Glu Ser Leu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Gln Asn Arg Glu Ile Ile
1 5 10 15

Lys Ile Asn Thr Gln Leu Ser Ile Lys Ile Arg Glu Ser Glu Asn Glu
20 25 30

Ile Gln Asp Leu Ile Gln Glu Asn Phe Thr Leu Lys Ser
35 40 45

<210> 22
<211> 45
<212> PRT
<213> yeast

<400> 22

Val Glu Asp Leu Lys Lys Lys Gln Ile Arg Gln Tyr Lys Glu Ile Ile
1 5 10 15

Arg Ile Ser Lys Ala Gln Ser Ile Arg Ile Lys Glu Leu Gln Leu Glu
20 25 30

Asn Glu Arg Leu Leu Ser Glu Asn Ile Asp Leu Arg Thr
35 40 45

<210> 23
<211> 45
<212> PRT
<213> yeast

<400> 23

Val Glu Asn Ile Arg Gln Ser Tyr Ser Arg Gln Asn Ser Leu Leu Ala
1 5 10 15

Lys Asp Asn Ser Ile Leu Lys Ile Lys Val Asn Ser Leu Glu Lys Lys
20 25 30

Ile Ser Gln Leu Val Gln Glu Asn Val Thr Leu Arg Ser
35 40 45

<210> 24
<211> 45
<212> PRT
<213> Neurospora crassa

<400> 24

Leu Glu Leu Leu Arg Arg Lys Phe Leu Arg Gln Asn Arg Asp Ile Ala
1 5 10 15

Arg Val Asn Ser Thr Gln Ser Leu Arg Ile Arg Gly Leu Glu Asn Glu
20 25 30

Cys Ala Arg Leu Leu Ser Glu Asn Leu Glu Leu Arg Gly
35 40 45

<210> 25
<211> 45
<212> PRT
<213> Dactylicapnos macrocapnos

<400> 25

Gly Ser Lys Val Glu Gln Gln Tyr Lys Leu Leu Asn Ala Glu Leu Met
1 5 10 15

Asp Gln Val Gln Lys Gln Arg Leu Glu Ile Gly Glu Tyr Arg Lys Arg
20 25 30

Val Ile Ser Leu Glu Arg Glu Ile Met Asp Ile Arg Glu
35 40 45

<210> 26
<211> 27
<212> PRT
<213> yeast

<400> 26

Gly Arg Glu Lys Leu Arg Arg Ser Val Lys Val Ile Asn Tyr Ala Ile
1 5 10 15

Pro Ser Leu Arg Thr Lys Leu Arg Arg Asp Phe
20 25

<210> 27
<211> 27
<212> PRT
<213> yeast

<400> 27

Pro Asp Gly Arg Ser Arg Arg Glu Arg Lys Lys Val Asn Tyr Ala Leu
1 5 10 15

Pro Gly Leu Arg Thr Lys Leu Arg Arg Asn Phe
20 25

<210> 28
<211> 28
<212> PRT
<213> yeast

<400> 28

Ser Phe Thr Arg Thr Arg Arg Thr Arg Gly Lys Ala Val Asp Tyr Thr
1 5 10 15

Leu Pro Ser Leu Arg Ala Lys Met Arg Arg Pro Ser
20 25

<210> 29
<211> 28
<212> PRT
<213> *Neurospora crassa*

<400> 29

Glu Thr Ser Arg Pro Ser Arg Arg Ala Arg Ala Ala Ile Ser Tyr Thr
1 5 10 15

Glu Pro Asn Leu Arg Asp Lys Met Arg Arg Pro Thr
20 25

<210> 30
<211> 27
<212> PRT
<213> *Dactylicapnos macrocapnos*

<400> 30

Asn Ser Ala Arg Pro Ser Arg Ser Cys Arg Pro Thr Ser Leu Val Glu
1 5 10 15

Pro Ser Leu Lys Asn Lys Leu Arg Asn Gly Ser
20 25

<210> 31
<211> 28
<212> PRT
<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 31

Thr Val Arg Arg Gln Arg Ser Ala Lys Met Asn Ile Lys Ser Leu Lys
1 5 10 15

Glu Pro Ser Gly Lys Asp Lys Leu Arg Arg Pro Gly
20 25

<210> 32

<211> 29
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 32

Thr Val Gly Arg Pro Ser Arg Gln Ala Ala Glu Lys Ile Lys Ser Tyr
1 5 10 15

Lys Glu Pro Ser Leu Lys Glu Lys Met Arg Gly Gly Phe
20 25

<210> 33
<211> 29
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 33

Ser Val Gly Arg Pro Ser Arg His Ala Ala Glu Lys Val Gln Ser Tyr
1 5 10 15

Arg Glu Val Ser Leu Arg Val Lys Met Arg Arg Lys Cys
20 25

<210> 34
<211> 28
<212> PRT
<213> mouse

<400> 34

Ala Val Ala Leu Thr Lys Arg Arg Cys Ser Thr Ile Lys Ser Tyr Lys
1 5 10 15

Glu Pro Thr Leu Ala Ser Lys Leu Arg Arg Gly Asp
20 25

<210> 35
<211> 25
<212> PRT
<213> mouse

<400> 35

His Pro Met Arg Arg Lys Arg Gln Cys Val Pro Leu Asn Leu Thr Glu
1 5 10 15

Pro Ser Leu Arg Ser Lys Met Arg Arg
20 25

<210> 36
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Val Ala Leu Pro Lys Arg Arg Cys Thr Ala Ser Val Asn Tyr Lys
1 5 10 15

Glu Pro Thr Leu Ala Ser Lys Leu Arg Arg Gly Asp
20 25

<210> 37
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Ser Glu Arg Thr Ser Arg Arg Arg Arg Cys Thr Pro Phe Tyr Phe Lys
1 5 10 15

Glu Pro Ser Leu Arg Asp Lys Met Arg Arg
20 25

<210> 38
<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial

<223> hSgol

<400> 38
aagucuacug auaaugucuu auu

23

<210> 39

<211> 23
<212> RNA
<213> Artificial

<223> hSgo2

<400> 39
aagcacuacc acuuugaaua auu

23

<210> 40
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

<223> BubR1

<400> 40
aacgggcauu ugaauaugaa a

21

<210> 41
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial

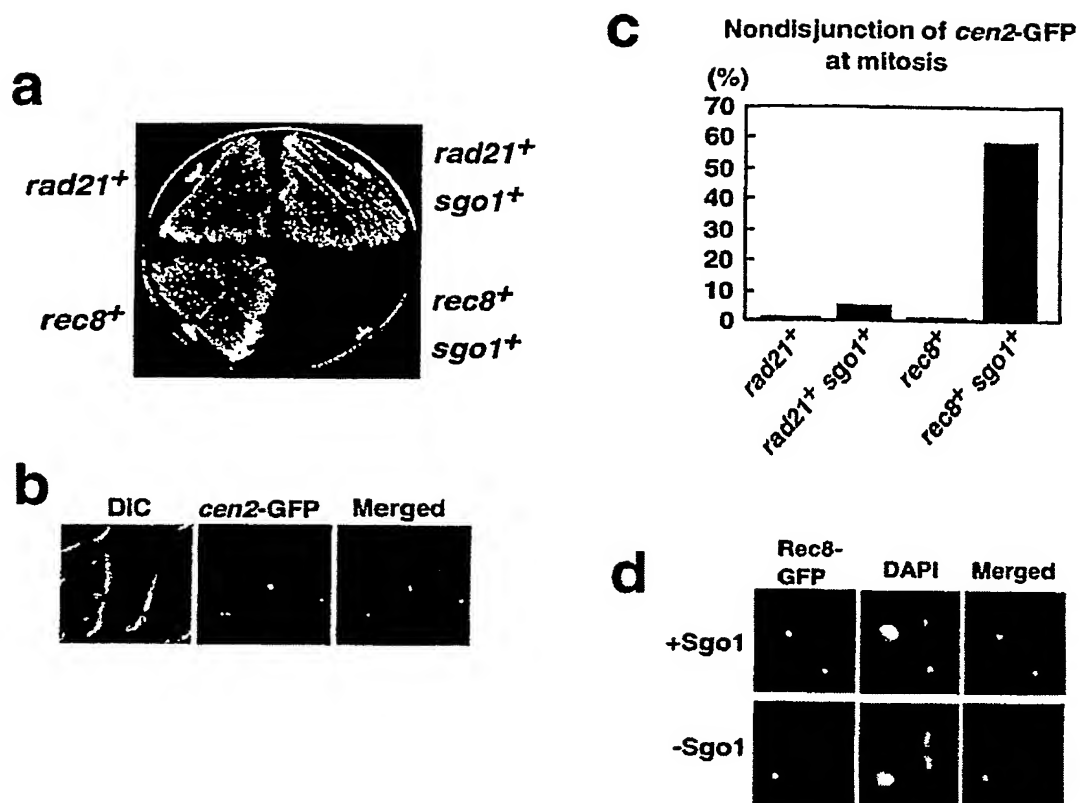
<223> Bub1

<400> 41
gagugaucac gauuucuaau u

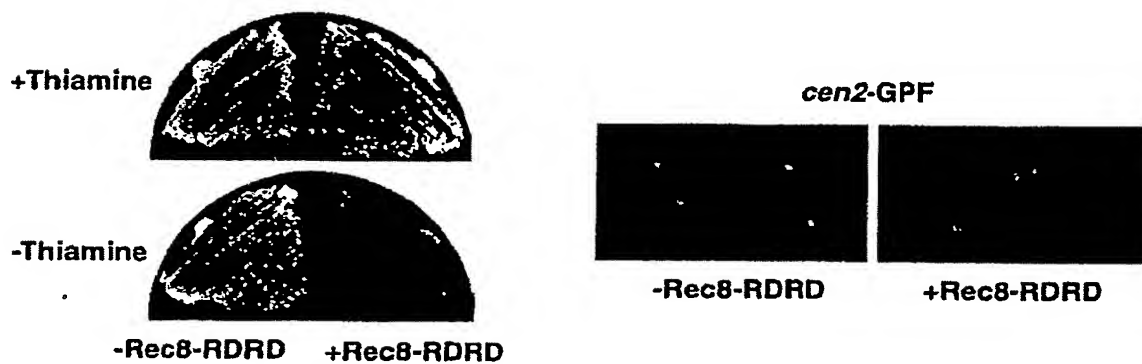
21

【書類名】図面

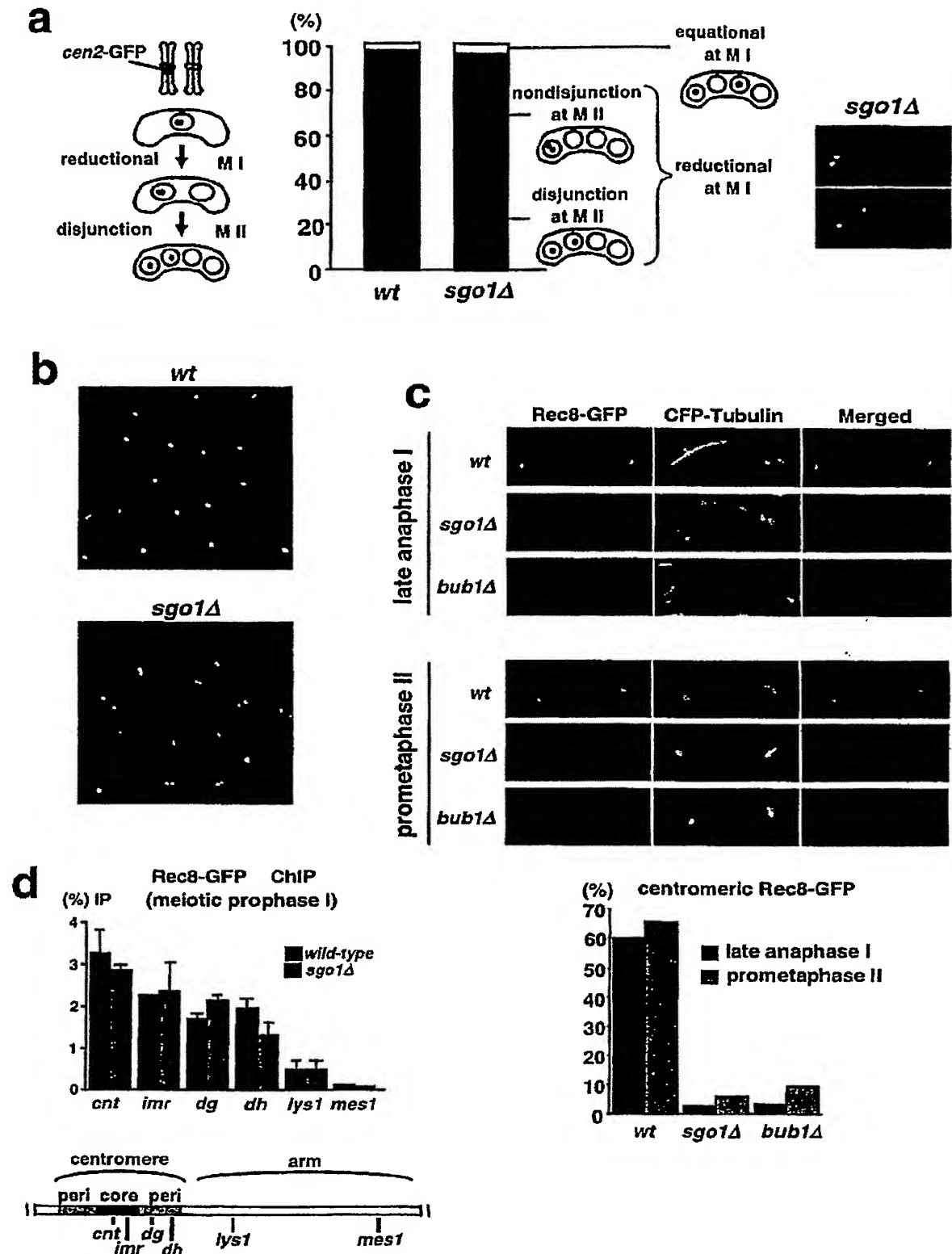
【図 1】



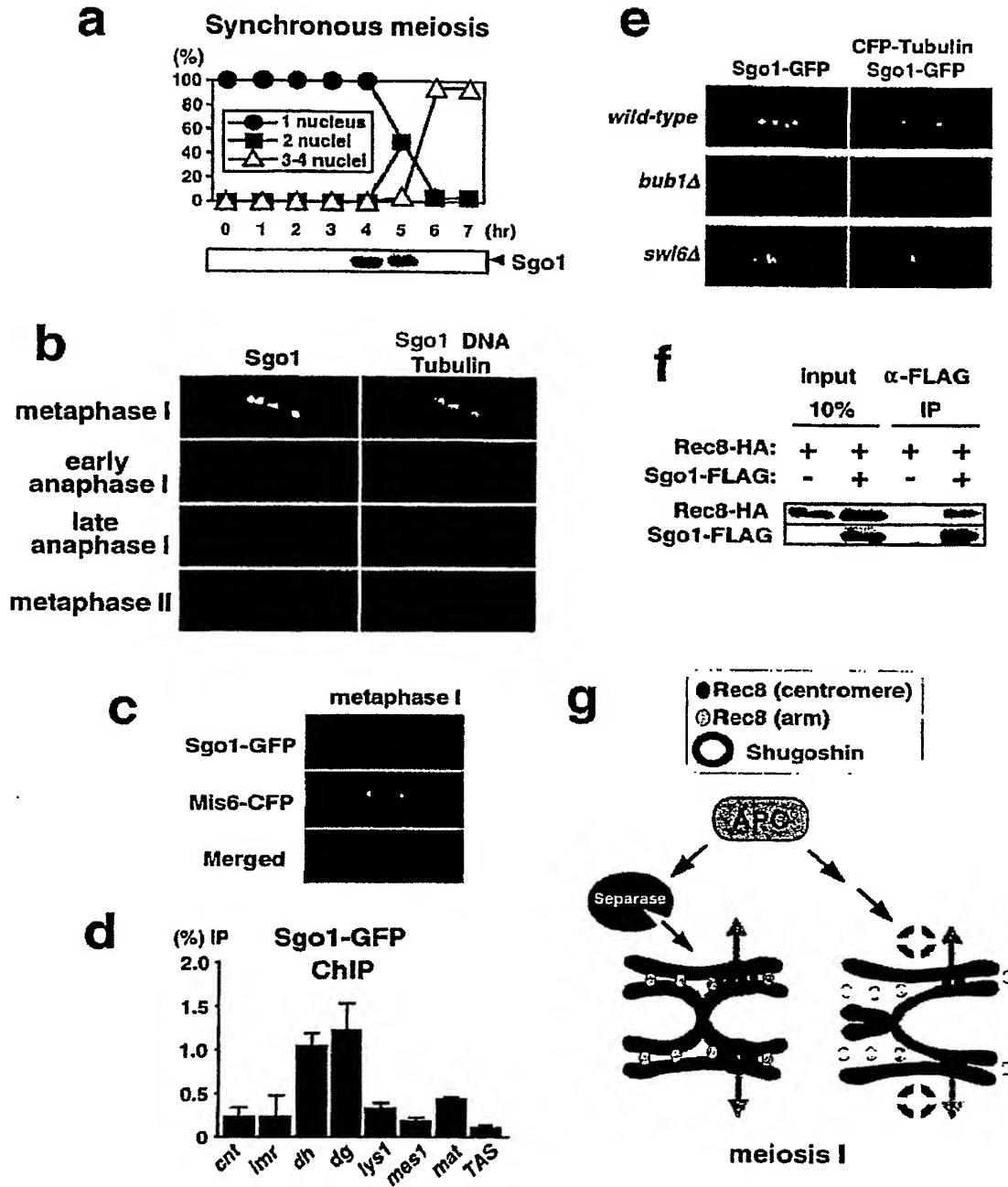
【図 2】



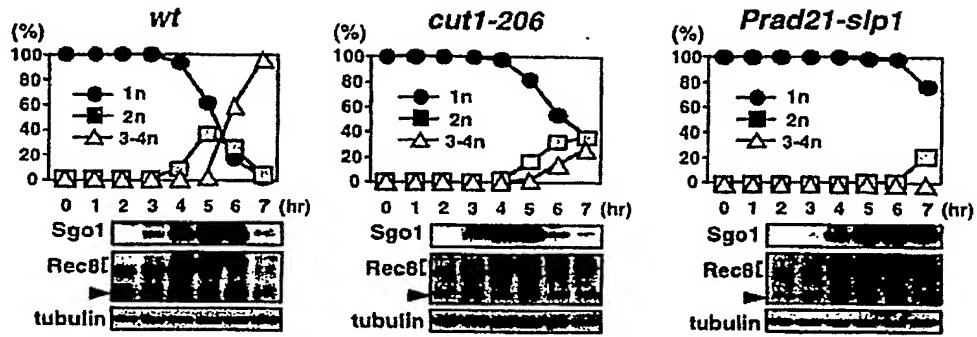
【図 3】



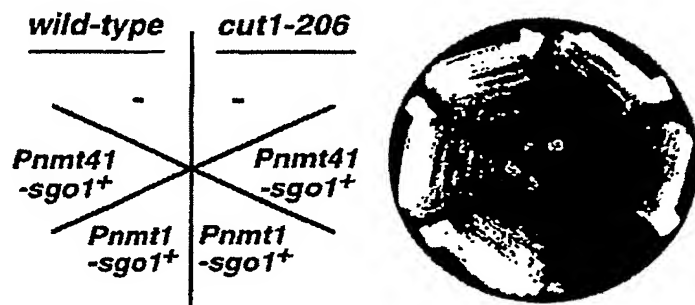
【図 4】



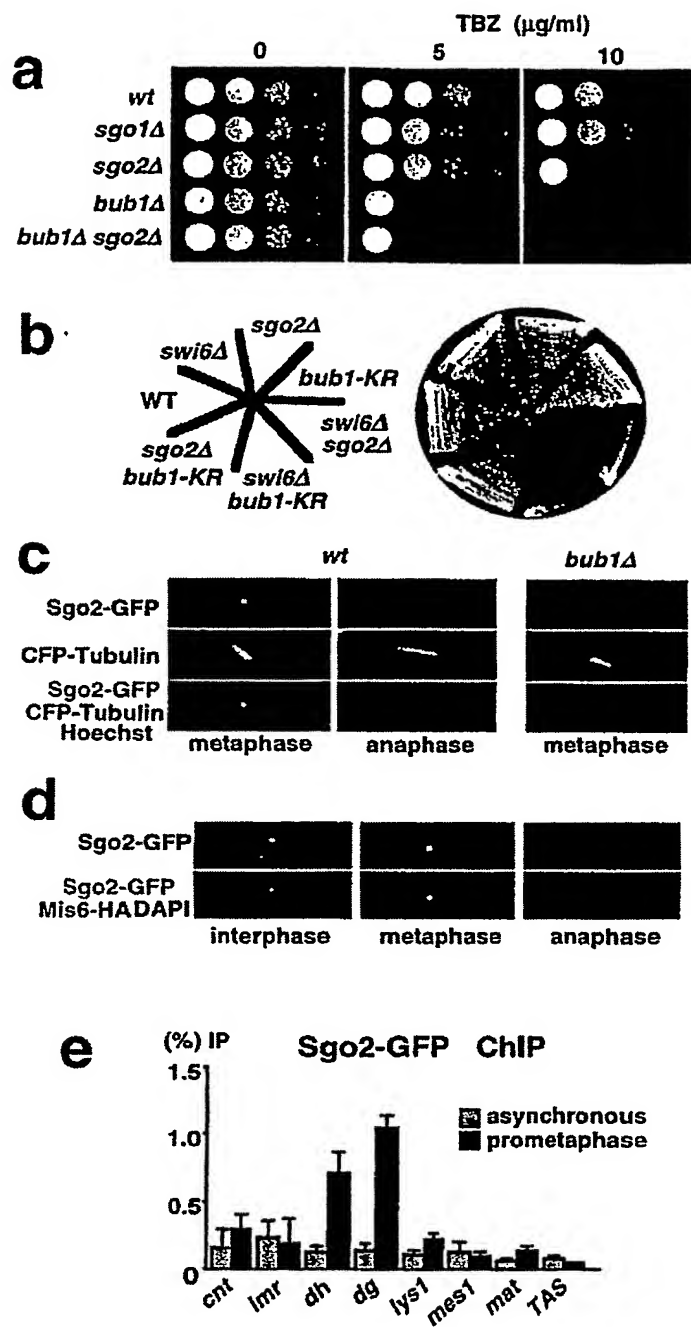
【図 5】



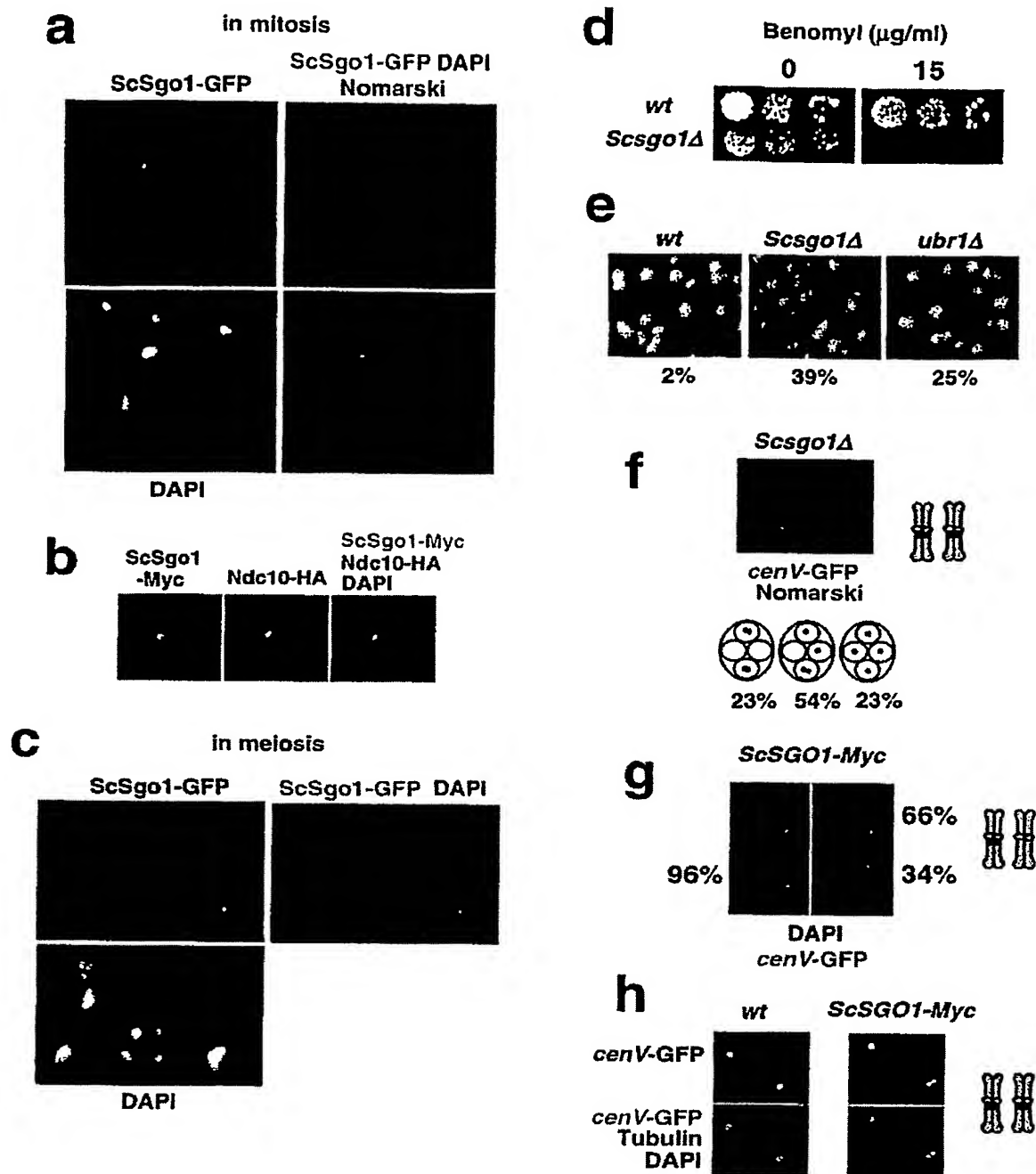
【図 6】



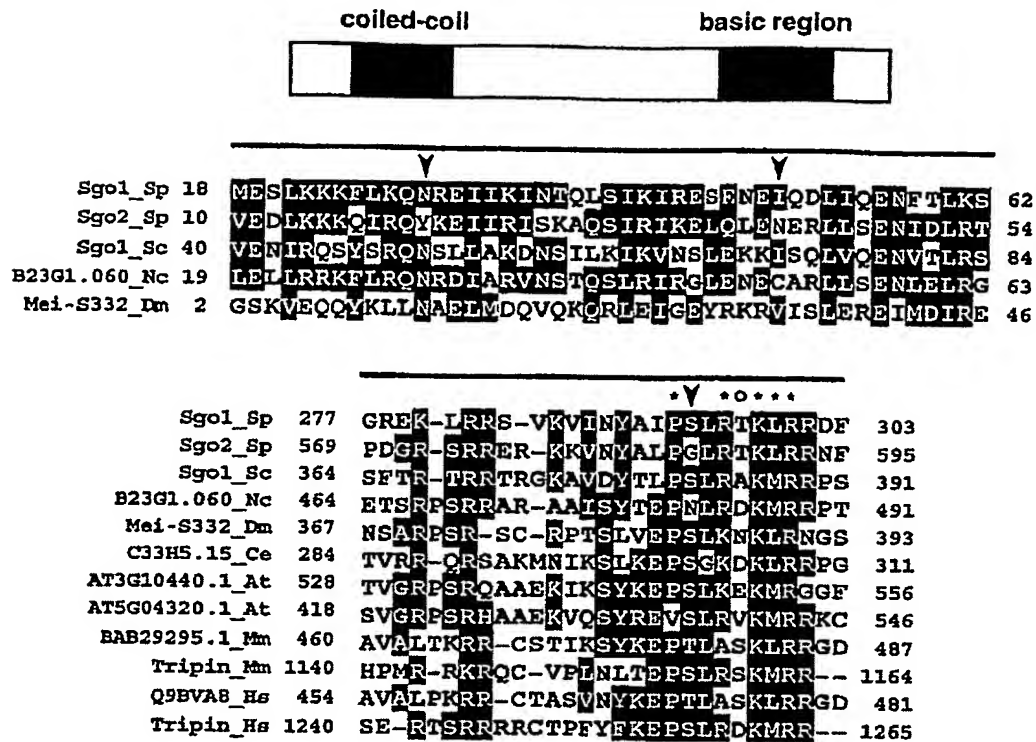
【図 7】



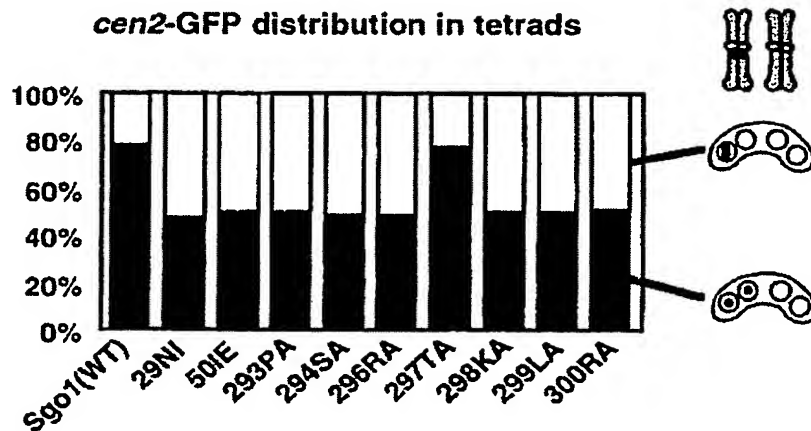
【図 8】



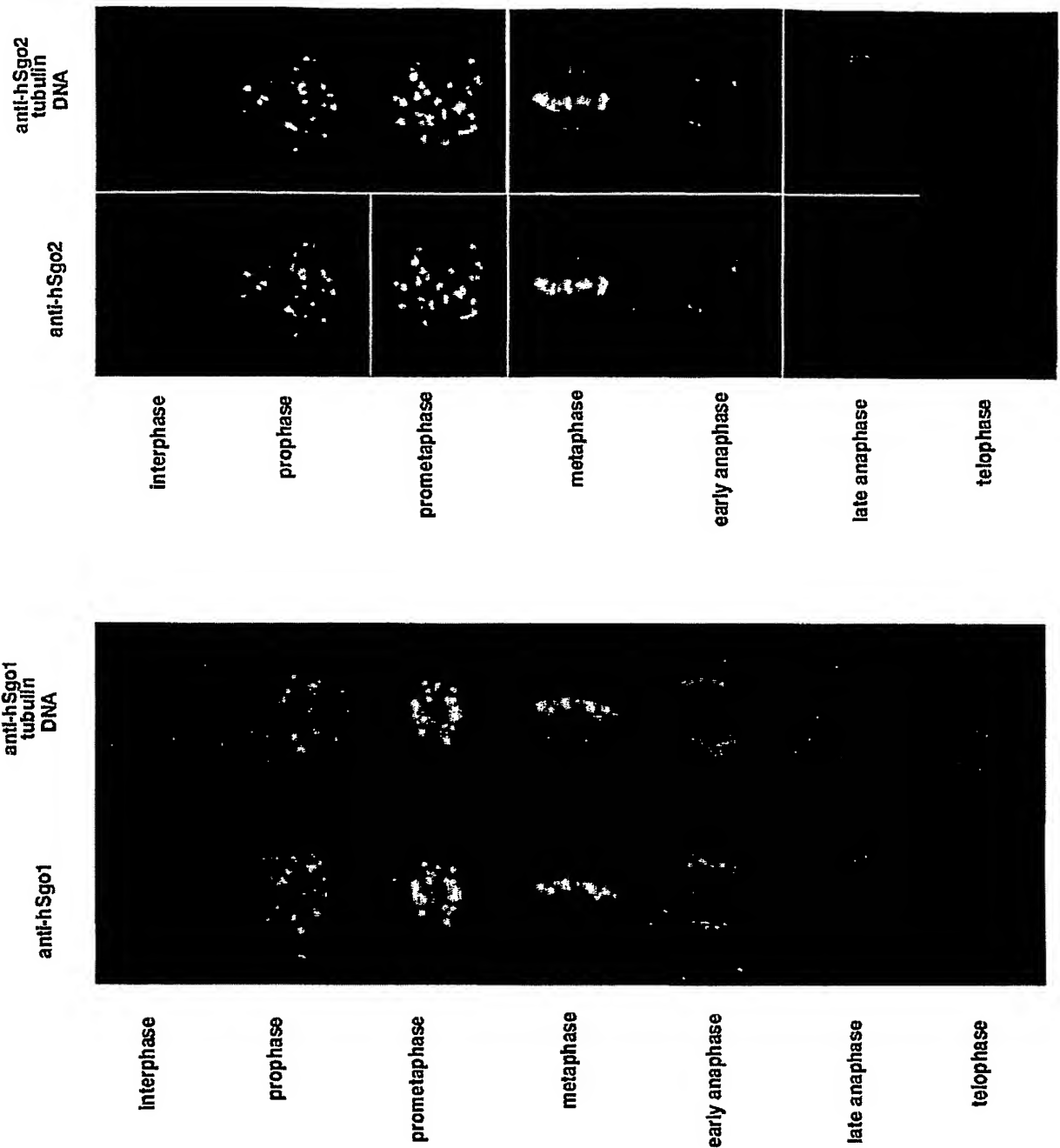
【圖 9】



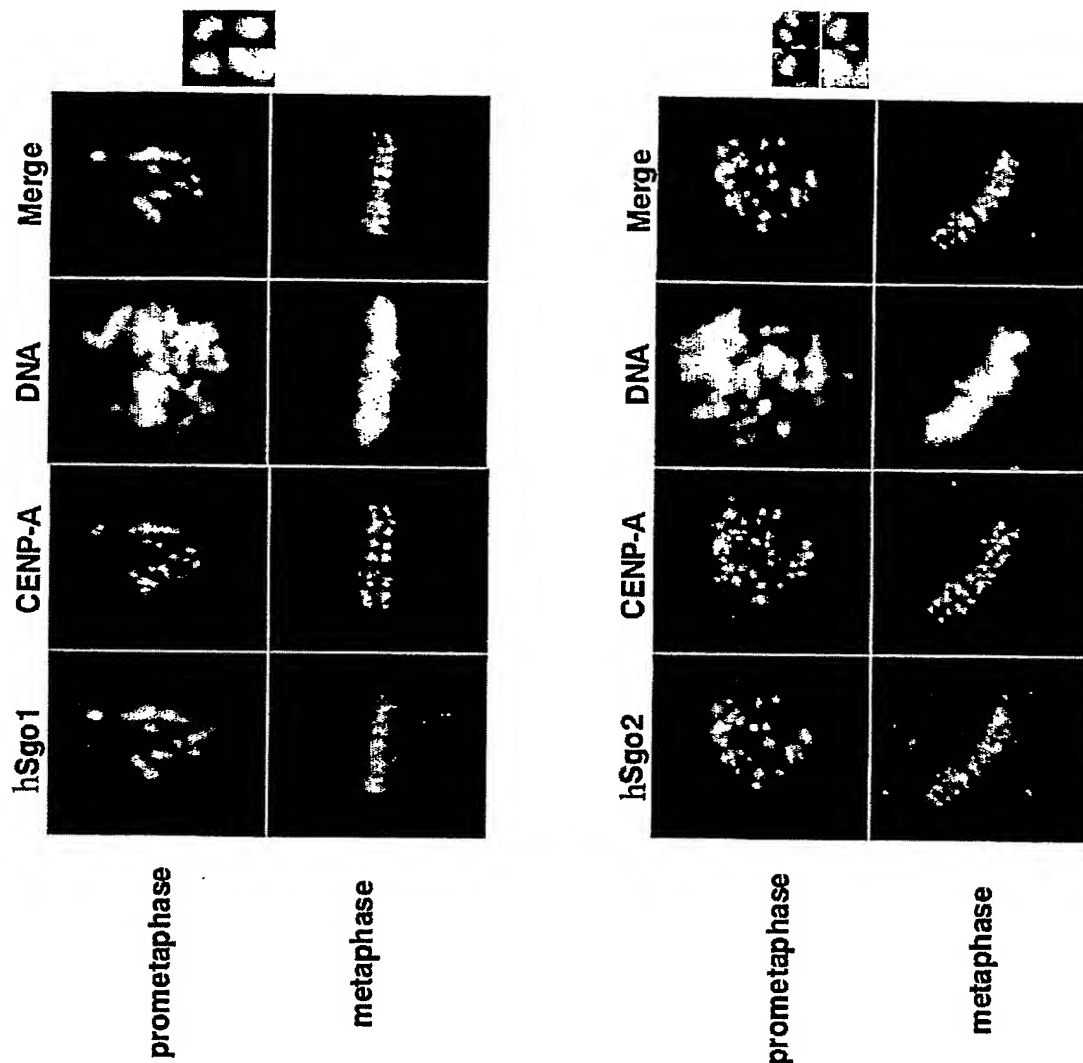
【図 10】



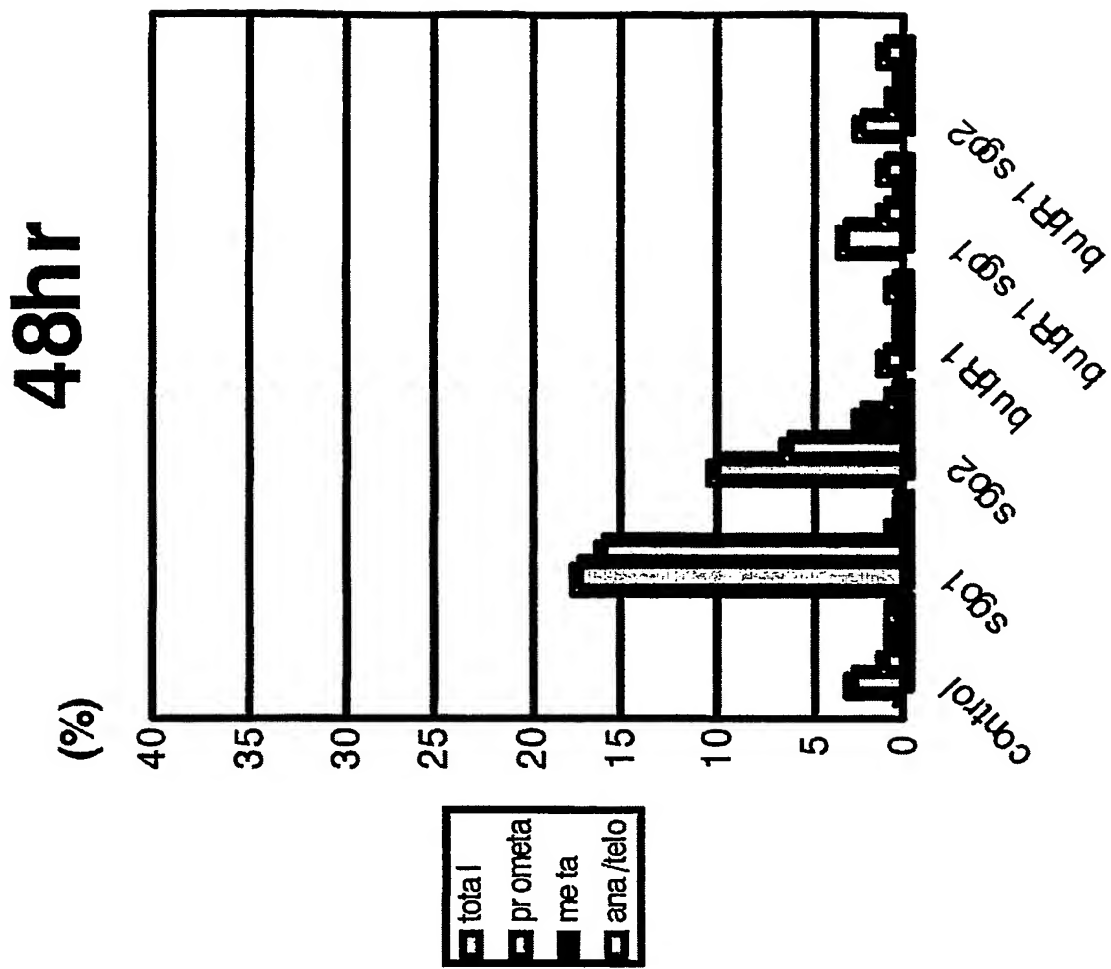
【図 11】



【図 12】



【図 13】



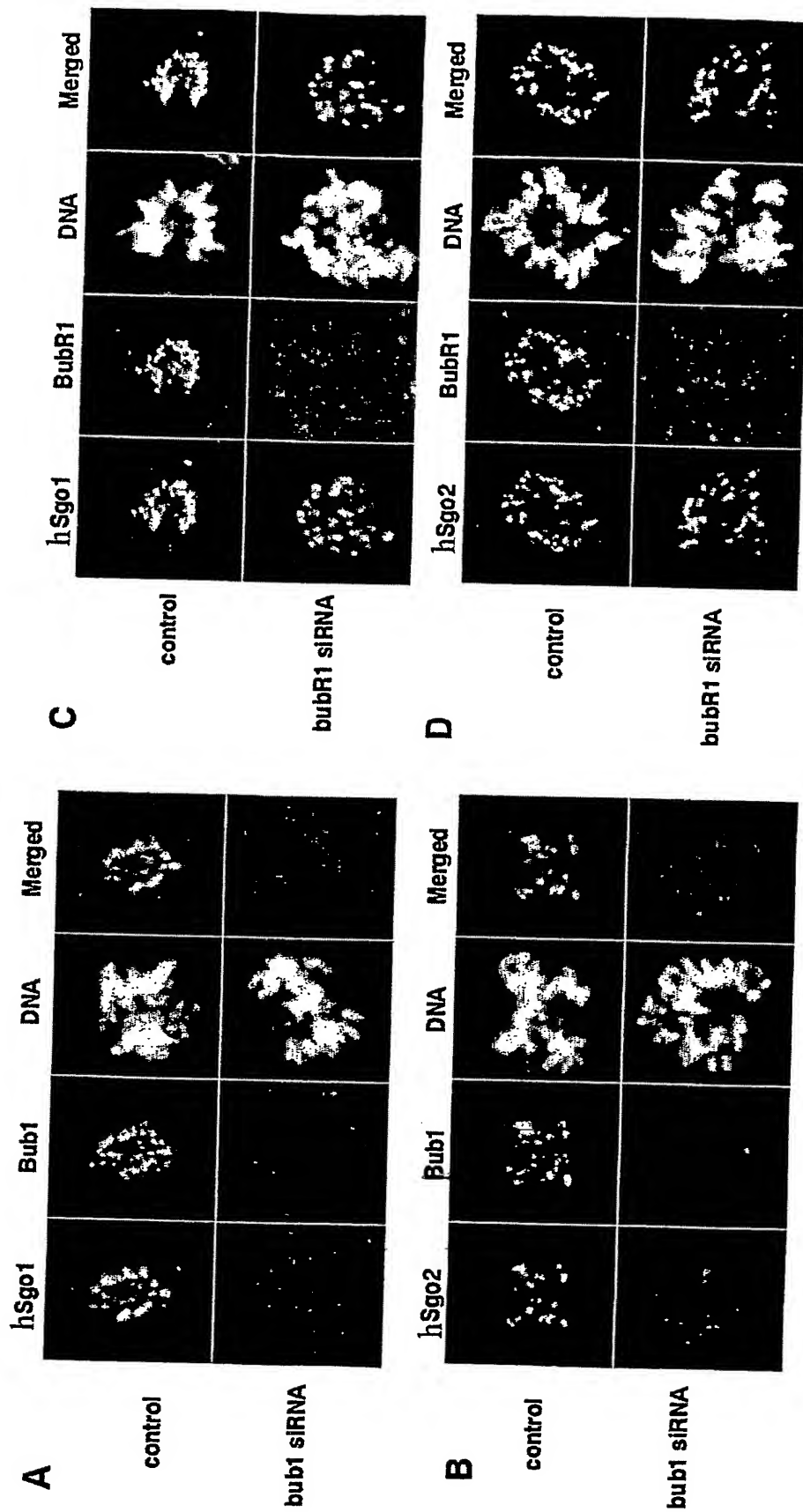
【図 14】

sgo1

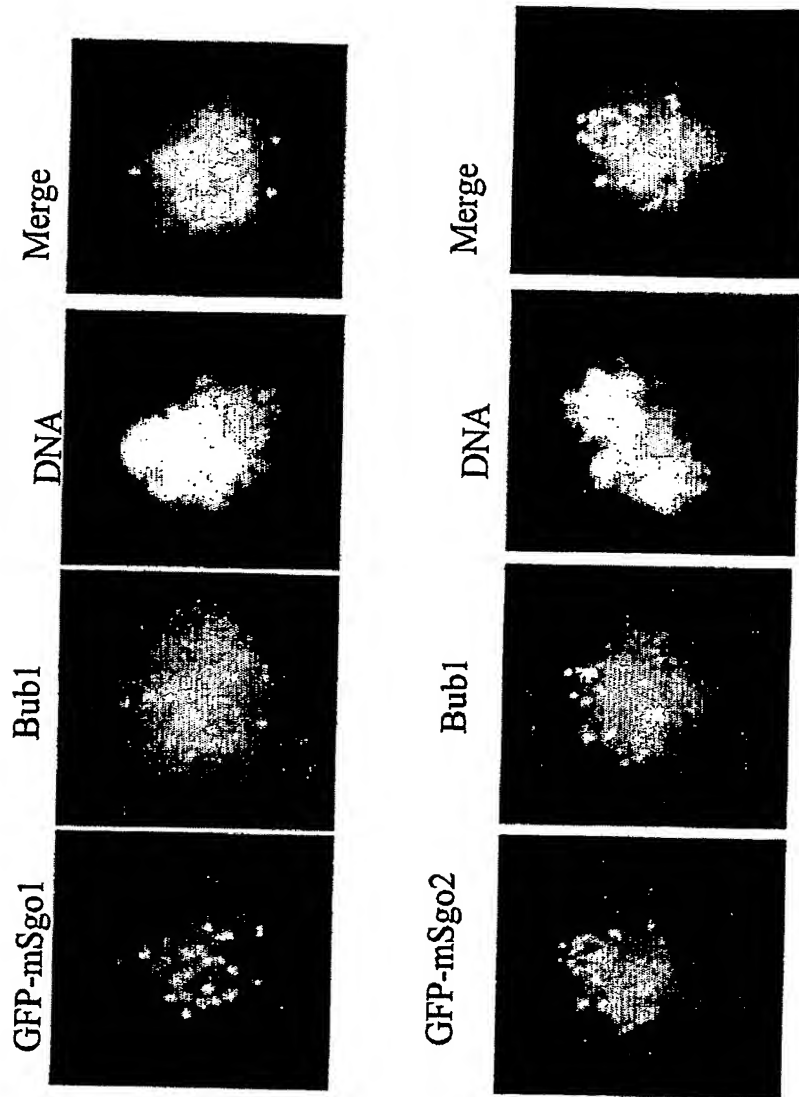
control



【図 15】



【図 16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 コヒーシンと協調して減数第一分裂における姉妹動原体の同一方向性及び接着の維持を保証する因子として、分裂酵母シゾザッカロミセス・ポンベに由来する減数分裂特異的な新規動原体タンパク質 S g o 1（シュゴシン）や、染色体分配制御活性を有するそのホモログやパラログ、並びにそれらをコードする DNA を提供すること。

【解決手段】 分裂後期に R e c 8 を保護するタンパク質を解明するために、R e c 8 と共発現する場合、有糸分裂の成長を抑制し、分裂後期における姉妹染色分体の分離を妨げる遺伝子を、分裂酵母遺伝子中にスクリーニングした。このアプローチにより、第一分裂後期において動原体性の R e c 8 を分解から保護（守護）する減数分裂特異タンパク質 S g o 1 を見い出す。また、出芽酵母の S g o 1 ホモログ及び分裂酵母の有糸分裂パラログ S g o 2 を見い出した。

特願 2 0 0 4 - 2 7 9 4 5 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日	2 0 0 4 年 4 月 1 日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名	独立行政法人科学技術振興機構

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/017428

International filing date: 24 November 2004 (24.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-279450
Filing date: 27 September 2004 (27.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 January 2005 (20.01.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.